FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1970

THESE

N° 409

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Marie-José LE PORS
Née le 20 janvier 1945 à SCRIGNAC (Finistère)

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE : . . . . . .

PRATIQUE ET VALEUR DU TEST D'INHIBITION METABOLIQUE DE LA FERMENTATION DU GLUCOSE POUR LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES INFECTIONS A MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Président : Mr. D. CHRISTOL, Professeur

EDITIONS A. G. E. M. P.

40 RUE PASCAL PARIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551512_0009

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1970

THESE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Marie-José LE PORS
Née le 20 janvier 1945 à SCRIGNAC (Finistère)

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE : . . . . . .

PRATIQUE ET VALEUR DU TEST D'INHIBITION METABOLIQUE DE LA FERMENTATION DU GLUCOSE POUR LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES INFECTIONS A MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Président : Mr. D. CHRISTOL, Professeur

EDITIONS A. G. E. M. P.

40 RUE PASCAL PARIS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma grand-mère

En gage de ma profonde admiration.

A mes parents

A ma soeur

Avec toute mon affection.

A ma famille

A mes Amis.

A Monsieur le Professeur R. FASQUELLE

Membre de l'Académie de Médecine
Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine de Paris
Biologiste de l'Hôtel-Dieu

Qui m'a accueillie avec bienveillance
au sein du département de Microbiologie
de la Faculté.

En hommage très respectueux et reconnaissant.

A Monsieur le Professeur D. CHRISTOL

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine de Paris
Biologiste de l'Hôpital Claude-Bernard

Qui a eu la bienveillance de m'accueillir
dans son laboratoire

Qui m'a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de ma respectueuse reconnaissance.

A Madame le Docteur Y. PEROL

Maître de Conférences Agrégée à la Faculté de Médecine de Paris
Responsable de la section Virologie au Laboratoire central
de l'Hôpital Claude-Bernard

Qui m'a précieusement épaulée
dans la réalisation de ce travail.

Qu'elle veuille trouver ici l'expression
de ma gratitude et le témoignage de mon
admiration.

A mes Maîtres du département de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Paris

Monsieur le Professeur P. TOURNIER

Monsieur le Professeur L. LE MINOR

Madame le Professeur agrégé E. BERGOGNE

Monsieur le Professeur agrégé F. BRICOUT

Monsieur le Professeur agrégé Ch. CHANY

Monsieur le Professeur agrégé G. DAGUET

Monsieur le Professeur agrégé J. DUVAL

Monsieur le Professeur agrégé Ph. GOULLET

Monsieur le Professeur agrégé H. MOLLARET

Monsieur le Professeur agrégé P. NEVOT

En hommage reconnaissant pour leur enseignement.

A Monsieur le Docteur A. JACQUOT

A Monsieur le Docteur R. DURIN

En remerciement de ce qu'ils m'ont appris.

A Madame L. JAILLARD

Technicienne au Laboratoire de Virologie de l'Hôpital Claude-Bernard

Pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée au cours de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères.

P L A N

I - INTRODUCTION

II - MYCOPLASMA PNEUMONIAE

- Sa découverte
- Son pouvoir pathogène
- Ses caractères microbiologiques

III - LES PRINCIPALES METHODES UTILISEES POUR LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES INFECTIONS A MYCOPLASMA PNEUMONIAE

- Les techniques non spécifiques
- L'immunofluorescence
- La déviation du complément
- L'immunodiffusion
- L'hémagglutination indirecte
- L'inhibition de l'hémagglutination
- L'agglutination spécifique
- L'inhibition de croissance révélée par :

  Observation des colonies
  Hémolyse
  Inhibition de la réduction du chlorure de tétrazolium
  Inhibition de la fermentation du glucose

IV - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE TITRAGE DES ANTICORPS SPECIFIQUES ANTI MYCOPLASMA PENUMONIAE PAR INHIBITION DE LA FERMENTATION DU GLUCOSE

1) Les sérums
2) Le matériel
3) L'antigène
4) Etude cinétique du virage de l'indicateur de pH en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation
5) Modalités du titrage de l'agent infectieux
6) Comparaison des titres obtenus dans des milieux avec et sans glucose
7) Conduite du titrage des sérums par inhibition de la fermentation du glucose
8) Mise en évidence de l'inhibition de croissance que traduit la non-fermentation par un sérum positif
9) Etude des principaux facteurs de la réaction :
   a) Rôle du titre de l'inoculum dans la sensibilité de la réaction
   b) Rôle des facteurs sériques indispensables
   c) Inhibiteurs non spécifiques des sérums.

V - ETUDE COMPARATIVE DES RESULTATS OBTENUS PAR INHIBITION DE LA FERMENTATION DU GLUCOSE ET PAR DEVIATION DU COMPLEMENT

VI - BILAN DE NOS RESULTATS

1) Etude des cas où nous avons observé une montée franche des anticorps inhibant la fermentation du glucose due à Mycoplasma Pneumoniae
2) Etude des cas où un titre stable d'anticorps inhibant la fermentation du glucose a été démontré
3) Bilan des paires de sérum témoignant d'une baisse des anticorps inhibant la fermentation du glucose
4) Bilan des sérums isolés inhibant la fermentation du glucose par Mycoplasma Pneumoniae
5) Bilan des sérums ne contenant pas d'anticorps inhibant la fermentation du glucose à la dilution 1/8.

VII - CONCLUSION.

*

* *

I - INTRODUCTION

Le diagnostic biologique des infections humaines à Mycoplasma Pneumoniae est difficile, mais il est aussi d'une grande importance, les infections dues à ce germe représentant une proportion notable des infections respiratoires et des pneumonies ; et l'on sait la raréfaction actuelle de la classique pneumonie franche lobaire aiguë à pneumocoque. L'importance de ce diagnostic nécessite donc qu'on y attache le plus grand soin. Il repose sur des examens de laboratoire qui sont de deux ordres :

1) l'isolement et l'identification de la bactérie à partir des prélèvements du malade,
2) la mise en évidence d'une ascension des anticorps spécifiques dans deux sérums séparés par un intervalle d'une vingtaine de jours.

Si dans un certain nombre de publications le diagnostic repose sur ces deux données (75, 145, 17, 95, 4, 140, 9, 60, 61, 109, 86, 14, 114, 54, 48, 69, 5, 88, 123, 1, 57, 142, 137, 82, 67), l'isolement est en fait rarement pratiqué. En effet, il suppose un certain nombre de conditions particulières :

- Les prélèvements doivent être faits spécialement dans ce but et déchargés dans un milieu de transport contenant de la pénicilline pour éviter la flore associée, mais ne contenant pas d'antibiotiques actifs sur le germe (streptomycine, kanamycine, cyclines...).

- Le germe étant fragile, ces prélèvements doivent être mis en culture rapidement ou conservés au froid à -60°C.

- Le bouillon de coeur de boeuf et la gélose enrichis de sérum de poulain et d'extrait de levure selon la formule de Hayflick doivent être spécialement préparés pour l'isolement du seul Mycoplasma Pneumoniae.

- Le germe n'étant pas colorable par les techniques bactériologiques courantes, il ne peut être reconnu que par l'aspect de ses colonies ;

c'est-à-dire que les milieux liquides doivent être repiqués sur un milieu solide où les colonies apparaissent du 6ème au 20ème jour si de nombreux saprophytes n'ont pas envahi ces milieux malgré la présence d'acétate de thallium et de pénicilline. L'isolement de Mycoplasma Pneumoniae est donc long et demande des soins minutieux et constants. Il faut dire enfin que l'isolement de ce germe n'a jamais, à lui seul, prouvé que la maladie en cours est provoquée par cet agent infectieux puisqu'il a également été isolé de porteurs sains.

Tout ceci explique que l'isolement soit souvent négligé au profit du seul diagnostic sérologique. Celui-ci est facilement réalisable en grandes séries lorsqu'une des techniques décrites ci-dessous a été bien mise au point. Il permet un diagnostic rétrospectif et peut être réalisé avec les paires de sérum prélevées pour le diagnostic des pneumopathies virales, ou au cours d'enquêtes épidémiologiques, surtout si l'on dispose d'une sérothèque en milieu hospitalier. Il serait souhaitable en effet de la pratiquer avec un esprit de recherche systématique sur les paires de sérums prélevées chez les malades atteints de manifestations cliniques dont l'étiologie est imprécise ; il est probable que le pouvoir pathogène naturel de Mycoplasma Pneumoniae n'est pas encore connu dans son ensemble. Enfin, la récente mise au point de vaccins rend nécessaire le dépistage des sujets immunisés et le contrôle de la séroconversion post-vaccinale.

C'est pour ces diverses raisons que de nombreuses techniques sérologiques ont été décrites ces dernières années. Nous avons tenté de réaliser et d'étudier l'une d'entre elles dans le but de disposer d'une technique simple, reproductible, dont la spécificité aille de pair avec une sensibilité suffisante.

Dans une première partie, nous rappellerons brièvement les étapes successives de la découverte de Mycoplasma Pneumoniae, ses caractères bactériologiques et son rôle en pathologie humaine. Puis nous décrirons les différentes méthodes utilisées pour le diagnostic sérologique de l'infection par ce germe.

Dans une deuxième partie, nous exposerons les travaux qui nous ont permis de mettre au point le titrage des anticorps spécifiques anti Mycoplasma Pneumoniae par inhibition de le fermentation du glucose. Puis nous rapporterons les premiers résultats obtenus et nous les comparerons à ceux que nous donne la déviation du complément.

II - MYCOPLASMA PNEUMONIAE
SA DECOUVERTE, SON POUVOIR PATHOGENE, SES CARACTERES MICROBIOLOGIQUES

Au cours de ces dernières années, de nombreux livres, symposiums et revues ont été consacrés aux mycoplasmes autrefois dénommés PPLO (Péripneumonia-like organisms) (55, 76, 111, 63, 10) ; ils ont également inspiré une revue générale en langue française (99).

Parmi les bactéries de ce genre, créé par Nowak en 1923, un des mycoplasmes les plus récemment décrits et les plus étudiés, le seul dont le pouvoir pathogène pour l'homme soit établi avec certitude, est Mycoplasma Pneumoniae dont le nom est admis depuis 1963 pour désigner l'agent d'Eaton.

1 - SA DECOUVERTE

A la suite des épidémies de la deuxième guerre mondiale, des recherches extensives sont entreprises pour isoler l'agent infectieux responsable de la pneumonie atypique dite primitive dont l'évolution s'accompagne de l'apparition d'agglutinines froides.

Dès 1944, Eaton et ses collaborateurs isolent sur oeuf embryonné, à partir des filtrats des sécrétions pharyngées de malades atteints de Pneumonie atypique primitive, un agent transmissible en série (38). Bien que les oeufs ne présentent aucune lésion décelable, les broyats de poumon et de trachée de l'embryon inoculés par voie intranasale au hamster ou au rat du coton, provoquent une pneumonie qui peut être prévenue par adjonction de sérum de convalescent de pneumonie atypique primitive (PAP). Cet agent infectieux traverse les filtres, il est de petite taille et considéré comme un virus. Cependant, son rôle étiologique est discuté. La production des lésions pulmonaires chez le rat du coton ou le hamster est inconstante ; parfois même, seul un virus de sortie est recueilli, car ces animaux sont porteurs de virus latents dont le pouvoir pathogène est exalté par le traumatisme de l'inoculation.

Il faut attendre treize ans pour que la découverte de l'agent d'Eaton soit magistralement confirmée par LIU qui le met en évidence dans le cytoplasme des cellules épithéliales de la trachée, des bronches, et des alvéoles de l'embryon de poulet grâce à la technique des anticorps fluorescents (83). Par immunofluorescence indirecte, LIU montre que 80 à 95 % des convalescents de PAP à agglutinines froides élaborent des anticorps sériques contre l'agent d'Eaton (84).

La reproduction de la maladie par inoculation à des volontaires confirme largement le rôle pathogène de l'agent d'Eaton (18, 31). Réalisée par voie aérienne chez des volontaires ne possédant pas d'anticorps décelables en immunofluorescence, elle est suivie d'une élaboration des anticorps à la 3ème semaine et Mycoplasma Pneumoniae est isolé avec une grande fréquence de 3 à 13 jours après l'inoculation.

En 1961, différents arguments donnent à penser que l'agent d'Eaton n'est pas un virus mais une bactérie très particulière par ses exigences.

1°) Elle peut être cultivée en dehors des cellules. Goodburn et Marmion (58, 93), après surcoloration au giemsa de coupes d'embryons de poulet infectés, la découvrent en microscopie optique comme de minuscules coccobacilles formant une couche compacte à la surface des cellules épithéliales. Dans les cultures cellulaires d'embryon de poulet ou de cellules rénales de singe infectées, ces coccobacilles sont groupés en colonies collées à la surface des cellules ; et toujours, ces amas de coccobacilles répondent à des zones d'immunofluorescence spécifique.

2°) Ces agents infectieux sont sensibles à certains antibiotiques (39, 40, 94), streptomycine, cyclines, comme les rickettsies et les myagawanelles, mais de plus leur croissance est inhibée par les sels d'or organiques comme l'aurothiomalate de sodium (92). Or cette sensibilité aux sels d'or organiques est connue en tant que propriété caractéristique des Mycoplasmes alors que virus et myagawanelles y sont indifférents.

La nature mycoplasmique de l'agent d'Eaton est définitivement établie en 1962 par Chanock, Hayflick et Barile (19). Tenant compte du fait que cette bactérie ne pousse qu'au contact des cellules, ces auteurs incorporent dans un milieu enrichi de l'extrait de levure et obtiennent des colonies

granuleuses qui, transférées sur des lames de verre, montrent la fluorescence spécifique de l'agent d'Eaton.

Depuis, Mycoplasma Pneumoniae a donné lieu à des études extensives.

2 - SON POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL

Le pouvoir pathogène de Mycoplasma Pneumoniae pour les cultures cellulaires, l'oeuf embryonné ou l'animal n'est plus guère utilisé au laboratoire comme moyen d'étude à l'exception de la préparation sur oeuf embryonné des antigènes servant à l'immunofluorescence.

Cependant, la croissance de Mycoplasma Pneumoniae dans les cellules en culture est un modèle intéressant des relations hôte-parasite. Larin et collaborateurs (79) ont montré que dans des cultures de cellules de poumon d'embryon humain fibroblastiques et diploïdes, Mycoplasma Pneumoniae inoculé à haute multiplicité d'infection se développe aussi bien en association avec la cellule qu'en situation extra-cellulaire, alors qu'à faible multiplicité d'infection, on ne le retrouve plus qu'associé à la cellule. Ce système expérimental devrait donc être utilisé dans l'étude de ces germes et en particulier dans la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques.

3 - SON POUVOIR PATHOGENE NATUREL

Mycoplasma Pneumoniae est l'agent étiologique de la pneumonie atypique primitive avec agglutinines froides, mais aussi d'une proportion importante de pneumonies atypiques sans élaboration d'agglutinines froides, voire de pleuropneumonies.

La reproduction de la maladie par inoculation du germe à des volontaires a d'autre part montré que la majorité des infections humaines ne s'accompagne pas de signes cliniques évidents de pneumonie, que l'infection basse du tractus respiratoire dont ce germe est responsable peut être inapparente, ou bénigne, sans signes radiologiques.

Il a de plus été démontré que ce germe est responsable, bien que plus rarement, d'infections bénignes des voies respiratoires supérieures (rhinites, pharyngites, trachéites), d'otites moyennes et de tympanites bulleuses.

Enfin, un certain nombre de symptômes ou de syndromes ont pu être observés au cours d'infections à Mycoplasma Pneumoniae prouvées par l'élaboration d'anticorps spécifiques :

- Erythème noueux
- Erythème polymorphe
- Syndromes de Stevens Johnson typiques
- Pleurésies
- Péricardites
- Méningites aseptiques
- Méningoencéphalites
- Syndromes de Guillain-Barré
- et peut-être anémies hémolytiques.

S'agit-il de manifestations dues à l'infection par Mycoplasma Pneumoniae, ou la réponse sérologique est-elle un simple phénomène de rappel au cours d'une autre maladie ? S'agit-il d'infections doubles associant un virus et Mycoplasma Pneumoniae ? Seules des tentatives d'isolement largement pratiquées à partir des différents prélèvements pathologiques, des recherches virales concomitantes, des études sérologiques systématiques pourront répondre à ces questions.

Les infections à Mycoplasma Pneumoniae sévissent dans le monde entier. Aucune poussée épidémique notoire n'a été observée ; il existe une endémie permanente avec recrudescence à l'automne et au début de l'hiver. Dans la population civile, les cas sont sporadiques, les individus de tous âges peuvent être atteints. Dans les communautés, c'est avec prédilection une infection de l'adolescent et de l'adulte jeune. La propagation est lente, la durée moyenne de l'incubation est de deux semaines. La contamination d'individu à individu nécessite un contage massif et prolongé. L'isolement de Mycoplasma Pneumoniae obtenu plusieurs fois à la troisième semaine après le début de la maladie démontre l'existence d'une infection prolongée et pose le problème de porteurs de germes à l'état chronique malgré la présence d'anticorps sériques à un taux élevé.

4 - CARACTERES MORPHOLOGIQUES

Comme tous les mycoplasmes, cette bactérie ne possède pas de paroi rigide, elle n'est donc pas colorable par les techniques bactériologiques habituelles et sa morphologie ne peut être appréciée en microscopie optique.

Elle est de petite taille, mais si elle traverse les filtres dont les pores ont 180 à 250 m µ, ceci est dû en fait à son extrême plasticité et sa taille en microscopie électronique est de 500 à 1.000 mµ ; sa forme est améboïde, allongée, avec des protrusions fréquentes des bords cellulaires. Elle n'est limitée que par une membrane de 75 à 100 Å d'épaisseur constituée par trois couches :

- deux extrêmes opaques aux électrons et de nature protidique
- une moyenne, de densité moindre et contenant des lipides.

Le cytoplasme est dense et contient des ribosomes de 140 Å de diamètre. Les cellules les plus petites sont entièrement remplies par ces grains denses, alors que les plus larges ont une partie centrale relativement claire traversée par de fins filaments de 30 Å de long, semblables à ceux que l'on observe dans la région nucléaire d'une bactérie. On pense qu'ils répondent au D N A.

5 - CARACTERES CULTURAUX

Mycoplasma Pneumoniae est de culture délicate. Son développement optimum est obtenu à pH 7,8 à 36°C, en aérobiose dans une atmosphère à 5 % de CO_2. La culture en anaérobiose est possible.

Cette bactérie exigeante nécessite pour croître un milieu enrichi complexe à base de macération de coeur de boeuf que nous décrirons en détail plus loin.

Le sérum de cheval frais, non décomplémenté, apporte les protéines naturelles animales et le cholestérol. Son analyse a montré qu'il existait une protéine indispensable contenant huit acides aminés (dont la lysine). Son point isoélectrique et sa constante de sédimentation sont semblables à ceux de la $\alpha 1$ lipoprotéine. Son poids moléculaire est de $1,35.10^6$. Elle contient des lipides : cholestérol et phospholipide. Le facteur lipidique seul, ou la protéine seule, ne peuvent assurer la croissance des mycoplasmes, mais si les deux facteurs sériques sont reconstitués, la croissance devient possible.

C'est de la présence de ces deux facteurs, de leur proportion respective, que dépend la valeur d'un sérum ; c'est ainsi qu'un sérum de lapin, pauvre en cholestérol, est souvent insuffisant; mais si on l'additionne de 0,03 % de cholestérol ou d'un autre stérol, il devient utilisable pour la croissance de Mycoplasma Pneumoniae. L'extrait de levure apporte un facteur soluble, de faible poids moléculaire et thermostable.

En milieu liquide, la culture est à peine visible ; un léger trouble est appréciable seulement par comparaison avec un milieu témoin non inoculé. L'adjonction d'un colorant vital comme le rouge neutre qui colore légèrement les germes, montre que la culture est granuleuse, formée de colonies en suspension. La croissance est lente, le temps de division semble être de six heures en moyenne. Des titres infectants élevés sont obtenus en culture aérée et agitée ; si l'inoculum est trop important, le titre maximum est rapidement atteint et la culture perd rapidement sa viabilité par acidification secondaire. L'adjonction de rouge de phénol à un milieu liquide permet donc de déceler cette baisse de pH, voire de la corriger avec une solution de soude afin de conserver la viabilité.

Sur ce même milieu gélosé à concentration finale de 1 %, c'est-à-dire sur un milieu semi-mou, les colonies, qui ne sont décelables qu'à partir du troisième jour après l'inoculation, sont très petites, de 10 à 100 µ de diamètre, et visibles seulement en microscopie optique. Elles sont arrondies, granuleuses, muriformes, légèrement brunâtres en vieillissant, enchassées dans la gélose, mais ne donnant le classique aspect en "oeuf sur le plat" que si l'inoculum provient d'un milieu liquide.

6 - SES CARACTERES BIOCHIMIQUES

a) Mycoplasma Pneumoniae fermente de nombreux sucres : glucose, xylose, maltose, dextrine, amidon, avec acidification secondaire des milieux.

Seuls parmi les mycoplasmes humains, Mycoplasma Pneumoniae et Mycoplasma Fermentans font virer au jaune le rouge du phénol incorporé dans un milieu liquide additionné de 1 % de glucose.

b) Mycoplasma Pneumoniae secrète une hémolysine active sur les globules rouges de cheval, d'homme, de mouton, de lapin et de cobaye (118, 119)(Freundt 1962). Elle est soluble, capable de diffuser dans la gélose et

facile à mettre en évidence : on coule une mince couche de milieu gélosé, dans laquelle ont été incorporés les globules rouges, sur la boîte de pétri où les colonies de Mycoplasma Pneumoniae sont bien développées, du 10ème au 15ème jour ; vingt-quatre heures après, chaque colonie s'entoure d'une zone d'hémolyse totale de type beta.

La synthèse de l'hémolysine dépend des conditions nutritives. Elle n'est pas produite en anaérobiose, ni si les colonies sont trop denses, ni par des variants entraînés à croître en l'absence d'extrait de levure.

L'hémolysine est labile, rapidement détruite dans la gélose. Elle est dialysable, probablement non protéique et de faible poids moléculaire. Il semble s'agir d'un peroxyde, car elle est inhibée par la catalase, la peroxydase, et en ceci elle diffère de toutes les hémolysines bactériennes connues qui sont de nature protéique ou lipidique. Le milieu de croissance du mycoplasme possède une activité catalasique car il contient du sérum de cheval non inactivé par la chaleur ; mais cette activité est insuffisante pour inhiber complètement l'action de l'hémolysine. Parmi les mycoplasmes humains connus, seul Mycoplasma Pneumoniae produit une hémolyse totale de type beta pour les globules rouges de cobaye. Les autres mycoplasmes humains dans les mêmes conditions, ne donnent qu'une hémolyse de type alpha, incomplète, verdâtre, d'apparition retardée. Seul Mycoplasma Laidlawi la donne également. C'est dire que la mise en évidence d'une hémolyse de type beta pour les globules rouges de cobaye chez un mycoplasme provenant d'un produit pathologique humain est un élément important de son identification (25).

c) Certains mycoplasmes ont la propriété de s'attacher, non seulement à des surfaces de verre ou de polystyrène (121, 129), mais également sur des surfaces cellulaires : d'hématies (89), de cellules trachéales (117), de spermatozoïdes (130); ces cellules peuvent alors être agglutinées par une suspension de mycoplasmes ou adhérer à leurs colonies (89, 130, 131, 141). C'est ainsi que les colonies de Mycoplasma Pneumoniae adsorbent les hématies de poulet, de cobaye, de rat, de singe; cette hémadsorption est suivie dans un deuxième temps de la lyse des globules rouges (34).

Les cellules trachéales épithéliales de poulet, de rat, de singe, s'adsorbent également sur les colonies de Mycoplasma Pneumoniae et il semble que la fixation se passe au niveau des récepteurs neuraminiques. Le traitement

préalable des globules rouges ou des cellules épithéliales de la trachée par le Receptor Destroying Enzyme, la neuraminidase ou l'influenza B détache les sites d'adsorption récepteurs de Mycoplasma Pneumoniae. De même, le traitement préalable des colonies de Mycoplasma Pneumoniae avec du matériel contenant de l'acide neuraminique prévient l'adsorption des hématies ou des cellules du tractus respiratoire.

Les sites d'adsorption de Mycoplasma Pneumoniae sont spécifiquement bloqués par le sérum homologue et ne le sont pas par un sérum hétérologue. Il est donc possible d'étudier la nature des sites d'adsorption mycoplasmiques en déterminant la capacité qu'ont les différentes fractions du germe de bloquer l'action des anticorps inhibant l'hémadsorption. De telles études réalisées par Sobeslavsky et collaborateurs (117) suggèrent que les sites d'adsorption mycoplasmiques sont des lipides ou des lipo-protéines; l'un d'eux est le glycérophospholipide haptène. Cette affinité pour les épithéliums du tractus respiratoire marquée parmi les mycoplasmes humains, joue peut-être un rôle dans leur virulence, étant donné que ce type de fixation est une occasion unique pour le peroxyde (c'est-à-dire l'hémolysine) secrété par le germe, d'attaquer la membrane cellulaire sans être rapidement détruit par la catalase ou la peroxydase présente dans les milieux extracellulaires.

d) Les cultures vivantes de Mycoplasma Pneumoniae en milieu liquide hémagglutinent les globules rouges de singe Vervet, d'homme, de lapin ou de cobaye. Manchee et Taylor-Robinson (90) suggèrent que le mécanisme de l'attachement des Mycoplasmes aux globules rouges en suspension dans l'hémagglutination n'est pas le même que celui qui règle l'attachement des globules rouges aux colonies de mycoplasmes, c'est-à-dire l'hémadsorption.

En effet, le titre hémagglutinant n'est pas modifié si on utilise des globules rouges traités par la neuraminidase; mais il est vrai que ces deux groupes d'auteurs n'ont pas utilisé la même neuraminidase.

e) Le T.T.C. (ou chlorure de 2, 3, 5 triphényl tétrazolium) est réduit par une culture abondante de Mycoplasma Pneumoniae avec apparition d'une couleur rouge, même quand la culture est réalisée en aérobiose.

Le T.T.C. peut être incorporé dans une gélose ; un fragment d'agar porteur de colonie est renversé sur la gélose et provoque l'apparition d'un halo rose.

Seul Mycoplasma Laidlawi possède le même pouvoir réducteur ; les autres mycoplasmes humains ne réduisent le T.T.C. qu'en anaérobiose.

f) Le bleu de méthylène est un inhibiteur de la plupart des mycoplasmes. Seuls Mycoplasma Pneumoniae et Mycoplasma Laidlawi sont résistants à une concentration de 0,002 % en milieu solide et 0,1 % en milieu liquide. Cette propriété est utilisée pour réaliser un milieu sélectif pour l'isolement de Mycoplasma Pneumoniae, pour l'identifier parmi les autres mycoplasmes humains, voire pour l'isoler au sein d'une culture mixte de deux mycoplasmes.

7 - SES INHIBITEURS

Mycoplasma Pneumoniae résiste aux pénicillines, à la céphaloridine, la novobiocine, la cyclosérine (3), mais est inhibé par les cyclines (78), les macrolides : érythromycine, oléandomycine (110), la tylosine (3). En fait, l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques est difficile du fait de la lenteur de sa croissance, de la richesse en sérum de ses milieux de culture, et beaucoup d'inconnues persistent en ce domaine.

8 - SES CARACTERES ANTIGENIQUES

Mycoplasma Pneumoniae est complètement distinct du point de vue antigénique des autres mycoplasmes humains. Il a été démontré que les réactions hétérotypiques à titre faible observées entre Mycoplasma Pneumoniae et Mycoplasma Hominis type 1 et 2 d'une part, entre Mycoplasma Pneumoniae et Mycoplasma Salivarium d'autre part, par les techniques d'hémagglutination indirecte ou de fixation du complément ne sont pas dues à des communautés antigéniques mineures entre ces mycoplasmes : l'adsorption des antisérums hétérotypiques par les antigènes de Mycoplasma Pneumoniae, ou l'adsorption d'un sérum anti Mycoplasma Pneumoniae par des antigènes hétérotypiques, ne modifient en rien le nombre et l'intensité des lignes de précipitation spécifiques de chaque système antigène-anticorps obtenues en immunodiffusion. La comparaison des différentes souches de Mycoplasma Pneumoniae isolées, entre elles, montre qu'il s'agit d'un groupe d'agents très homogène où, pour l'instant, aucune variation antigénique n'est décelée.

La plupart des antigènes sérologiquement actifs sont situés dans les fractions lipidiques et peuvent être extraites par action des solvants organiques. Prescott, Sobeslovsky, Caldes et Chanock (102, 103) soumettent le culot d'une culture de Mycoplasma Pneumoniae, après l'avoir ultrasonnée, au fractionnement chimique et à la séparation chromatographique; ils isolent huit fractions : une fraction lipidique, des hydrates de carbone et quatre fractions riches en protéines.

Les lipides sont fractionnés par filtration sur gel de silice G en 9 composants distincts dont les trois premiers sont les seuls sérologiquement actifs en déviation du complément et ne contiennent pas le cholestérol indispensable à la culture du germe ; le cholestérol est présent sur la fraction 6.

L'activité sérologique et immunisante des différentes fractions obtenues est précisée : les composants polysaccharidiques sont intéressés dans les réactions de précipitation alors que les trois premiers composants lipidiques possèdent l'activité fixant le complément, mais ils ne sont que très faiblement immunisants, réduits à l'état d'haptène. Combinés aux protéines dans des complexes lipoprotéiques, ils sont hautement immunogènes, induisant des titres élevés d'anticorps fixant le complément, d'hémagglutination indirecte ou d'inhibition de croissance; mais la spécificité de ces anticorps dépend directement des constituants lipidiques sérologiquement actifs. On pense que ces lipides sérologiquement actifs sont présents sur les sites antigéniques de la membrane limitante de Mycoplasma Pneumoniae, là où l'anticorps agit pour inhiber la croissance de l'organisme.

Il n'est pas possible de sensibiliser des globules rouges tannés avec les différents lipides ou polysaccharides. Seules les fractions protéiques s'adsorbent aux globules rouges tannés. Mais les trois premières fractions lipidiques bloquent l'hémagglutination indirecte, c'est-à-dire qu'elles réagissent avec les anticorps qui agglutinent les globules rouges sensibilisés. Ceci suggère que la fonction essentielle des protéines dans l'hémagglutination indirecte est de servir de support aux lipides qui sont le facteur principal dans la réaction avec les anticorps agglutinants.

Kenny pour sa part (8) trouve deux fractions lipidiques distinctes actives nommées B et D, ce qui semble confirmer les travaux de Plackett et

collaborateurs (101). B est un composant riche en lécithine dont l'activité fixant le complément est mineure; il répond à des lipides décelés dans la bande caractéristique des acides phosphatidiques : phosphatidylglycérol et phosphatidylmonoglycéride qui fixe le complément avec des sérums humains à Bordet Wasserman positif. D contient presque toute l'activité fixante et répond essentiellement à des glycolipides : digalactosyl et trigalactosyl diglycérides, dihexosyldiglycéride contenant du glucose et du galactose et un trihexosyldiglycéride.

Ces notions apportent un jour nouveau sur les rapports entre Mycoplasma Pneumoniae et le streptocoque MG. Il n'est pas impossible que les glycolipides de Mycoplasma Pneumoniae aient des parentés antigéniques avec les glucosylglycérides du streptocoque MG ou avec les hydrates de carbone haptènes des membranes cellulaires des mammifères, telles que l'antigène I des globules rouges humains.

Les sérums de référence

Des sérums de référence sont utilisés d'une part dans l'identification et le titrage des antigènes et d'autre part comme contrôle de la sensibilité et de la spécificité dans chaque méthode de diagnostic sérologique.

Les sérums d'animaux hyperimmunisés sont en général des sérums de chevaux ou de lapins. Sohier utilise un sérum de cheval (11) anti-Mycoplasma Pneumoniae dont le titre doit être retrouvé à 32-64. Eng immunise des lapins (46) avec la souche Bard qu'il cultive sur un milieu préparé à partir de tissus de lapin et enrichi de sérum de lapin. Après cinq passages sur un tel milieu solide à intervalle de deux à quatre jours, il inocule 300 ml de bouillon (également préparé à partir de tissus de lapin) à partir des quatrièmes et cinquièmes passages. Après quatorze jours d'incubation, on filtre sur gaze et on centrifuge à 20.000 g pendant quarante-cinq minutes. Le culot est remis en suspension dans 6 ml d'eau physiologique et additionné de merthiolate au 1/10.000ème. 2 ml d'antigène immunisant sont mis dans 2 ml de paraffine liquide et additionnés de 10 % d'un adjuvant, l'arlacel C. On obtient ainsi 4 ml d'une émulsion d'antigène et de paraffine. On fait deux injections intramusculaires de cette émulsion à 7 jours d'intervalle, puis après douze jours, on injecte en intraveineuse quatre doses d'antigène non traité (de 0,2 à

0,6 ml) à trois ou quatre jours d'intervalle. Quinze jours plus tard, le lapin est saigné et, dans l'exemple de Eng, donne un sérum positif au 1/640ème alors qu'il ne dépassait pas le 1/10ème avant l'immunisation.

Kenny prépare ses anti-sérums sur des lapins néozélandais (73) auxquels il injecte, dans la veine marginale de l'oreille quatre doses croissantes d'antigène (0,1 - 0,2 - 0,3 - et 0,4 ml) à trois, quatre jours d'intervalle. Les antigènes extraits par l'éther ou le chloroforme sont complets tandis que l'antigène lipidique n'est que faiblement antigénique, ayant été hapténisé par son mode de préparation.

Clyde (26) prépare ses antigènes par culture en milieu classique de Chanock. Le bouillon est centrifugé à 30.000 g et passé sur bougie 0,03 Selas pour éliminer tout ce qui aurait pu sédimenter avec l'antigène. On inocule ensuite des flacons de Erlenmeyer de deux litres contenant une couche d'agar de 50 ml surmontée d'un litre de bouillon. Ces flacons sont incubés à 37° en atmosphère humide à 5 % de CO_2. Après sept jours, la culture est recueillie, les germes sédimentés à 30.000 g et lavés trois fois dans une solution saline à 0,85 %. Le culot est remis en suspension dans une quantité de solution saline suffisante pour obtenir une concentration de 50 à 100 fois celle de la culture de départ. La suspension obtenue peut être conservée à -65°C pour immuniser des lapins. Des lapins albinos de 2 kg environ sont chargés selon la manière de Lemcke. On injecte 5 fois 1 ml en intraveineuse à deux jours d'intervalle, puis 1 ml d'antigène en suspension dans 1 ml d'adjuvant complet de Freundt en intramusculaire. Les animaux sont saignés trois à quatre semaines après la dernière injection et les sérums sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

*

* *

III - LES PRINCIPALES METHODES DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES INFECTIONS A MYCOPLASMA PNEUMONIAE

1 - LES TECHNIQUES SEROLOGIQUES NON SPECIFIQUES

En 1943, Turner (137), Peterson et collaborateurs (100) montrent que les malades atteints de pneumonie atypique élaborent des agglutinines froides au cours de leur infection : le sérum de ces malades agglutine à froid (+4°C) ses propres hématies ou celles du groupe O. Ces agglutinines froides apparaissent vers le septième jour, elles sont à leur maximum au quinzième jour, décroissent et disparaissent après la convalescence. La réaction n'est valable qu'à un taux de 1/64 au moins. Ces agglutinines froides sont des macroglobulines ou anticorps IgM, de spécificité anti I (145, 18, 33) (Dacie, 1962), distinctes des anticorps spécifiques décelés par immunofluorescence (84, 85), par fixation du complément ou inhibition de croissance (49). Mycoplasma Pneumoniae ou ses extraits n'adsorbent pas les agglutinines froides anti I, il est donc probable que Mycoplasma Pneumoniae ne contient pas l'antigène I des globules rouges humains. On sait qu'une anémie hémolytique transitoire peut accompagner un taux élevé d'agglutinines froides. L'hypothèse pathogénique la plus plausible est que l'hémolysine secrétée par Mycoplasma Pneumoniae altère l'antigène I des globules rouges in vivo lors de l'infection (105) et provoque par un mécanisme d'auto-immunisation une stimulation de la synthèse des anticorps anti I (113).

Quoi qu'il en soit, cette réaction n'est ni constante, ni spécifique. De nombreux malades infectés par Mycoplasma Pneumoniae n'élaborent pas d'agglutinines froides ; des affections diverses : cirrhoses, mononucléoses infectieuses s'accompagnent d'une élaboration d'agglutinines froides. Elle n'est donc qu'un élément d'orientation diagnostique.

En 1943 également, Thomas et collaborateurs (134) montrent que les malades atteints de pneumonie atypique élaborent quelquefois des agglutinines pour la souche MG de streptocoque non hémolytique fréquemment isolée

des crachats de ces malades; mais cela ne s'observe que dans 25 % des cas. Cependant Mycoplasma Pneumoniae pourrait-il représenter comme cela est suggéré par certains, la forme L du streptocoque MG ? Mais cette hypothèse est en réalité doublement infirmée : Mycoplasma Pneumoniae et le streptocoque MG n'ont pas d'antigène commun (135), et leurs ADN, bien qu'ayant le même pourcentage de Guanine-cytosine (39,3 %) ne peuvent être hybridés et n'ont donc pas les mêmes séquences d'amino-acides (87) alors qu'avec ces mêmes techniques, un proteus et sa propre forme L ont des ADN très semblables. La survenue d'agglutinines pour le streptocoque MG au cours d'une infection à Mycoplasma Pneumoniae ne peut donc s'expliquer que par l'altération des protéines naturelles de l'hôte libérant des antigènes fortuitement croisés avec ceux du streptocoque MG.

Ces réactions sérologiques non spécifiques : agglutinines froides et agglutinines pour le streptocoque MG, ont perdu l'importance qui leur était accordée jusqu'à présent pour le diagnostic des infections à Mycoplasma Pneumoniae et ont laissé la place aux réactions sérologiques spécifiques.

2 - L'IMMUNOFLUORESCENCE

C'est Chien Liu qui, en 1957 (83), a décidé le premier d'appliquer la technique d'immunofluorescence au diagnostic sérologique des pneumonies atypiques primitives dues à l'agent d'Eaton, obtenant par là des résultats reproductibles en série.

Grâce à cette méthode, Liu, Eaton et Heyl (84) ont mis au point un diagnostic sérologique spécifique de l'agent infectieux. Les anticorps fluorescents mis en évidence par la technique indirecte utilisant en guise d'antigène des coupes d'embryon de poulet conservées par congélation, apparaissent à la deuxième, troisième semaine de la maladie et persistent un an et plus ; il existe un parallélisme entre ces anticorps fluorescents et les anticorps neutralisant l'agent d'Eaton chez le rat du coton et 67 à 92 % des convalescents de PAP développent ces anticorps. Ces résultats trouvèrent confirmation aux USA : Chanock et collaborateurs (15), Cook et collaborateurs (29), Evans et collaborateurs (47), Clyde et collaborateurs (23); en Angleterre : Marmion et Goodburn (91); aux Pays-Bas : Hers et en France : Thivolet, Sohier, Picard et Blanc (133).

La technique utilisée est l'immunofluorescence indirecte qui donne une fluorescence et une définition meilleures que la méthode directe (133).

On peut utiliser deux sortes d'antigènes. Le premier est constitué par des coupes d'embryons de poulet infectés (83, 133); on inocule des oeufs embryonnés de treize jours par voie amniotique, puis après une incubation de sept jours à 35°, on prélève les poumons et la partie inférieure de la trachée. Il faut alors vérifier que les poumons ne sont pas souillés par d'autres bactéries et congeler immédiatement à basse température ; on peut ainsi les conserver à -70° C. On débite ces prélèvements en coupes de 4 à 6 microns avec un microtome à congélation; ce temps de la préparation est très important car il faut que les coupes soient de bonne qualité. Après dépôt sur une lame porte-objet, elles sont soumises à une décongélation brutale et fixées pendant dix minutes dans un bain d'acétone deshydratée et conservées à -20° C. Puis les coupes sont aérées pendant une heure et stockées à -20° C jusqu'à leur utilisation. Auparavant, on teste chaque poumon par un sérum témoin pour détecter les foyers de fluorescence spécifique. Chaque poumon fournit de 100 à 200 coupes.

Un deuxième antigène, d'obtention plus facile, est de moins bonne qualité ; il décèle des titres d'anticorps sériques moins élevés. Il est constitué de colonies jeunes de Mycoplasma Pneumoniae obtenues sur gélose enrichie (21). On découpe les fragments de gélose contenant les colonies et on les retourne contre la lame porte-objet de telle sorte que la colonie soit appliquée contre le verre. Les lames sont placées dans un vase à filtration chaude contenant de l'eau distillée portée à 80 - 90° C. Ainsi l'agar fond et laisse la colonie fixée sur la lame. On se débarrasse des débris de gélose par un lavage délicat à l'eau distillée à 90° C, on sèche et on fixe les colonies par l'acétone pendant dix minutes.

Qu'il s'agisse de sérums humains de convalescents ou de sérums de lapins immunisés par injection de broyat de poumon d'embryons de poulet infectés, on procède à une dilution dans du sérum frais de cobaye, lui-même dilué au 1/10 dans une solution salée tamponnée au véronal à pH 7. Liu a montré que les sérums frais d'homme et de cobaye contiennent un facteur

différent de la properdine et du complément, mais ayant des propriétés voisines de celui-ci, et qui favorise la réaction intervenant dans le phénomène d'immunofluorescence.

La méthode utilisée est donc la méthode indirecte réalisée en deux temps ; le premier temps consiste à déposer chaque dilution sérique sur une lame portant l'antigène (que ce soit la coupe d'embryon ou la colonie), et à les laisser en contact pendant trente à quarante minutes en chambre humide à la température du laboratoire (ou à 37°). On procède ensuite à un lavage par trempage pendant dix minutes dans une solution saline tamponnée à pH 7, et on essuie, sauf au niveau de la coupe ou de la colonie.

Dans un deuxième temps, selon que le premier sérum utilisé était un sérum humain ou de lapin, on dépose sur chaque coupe quelques gouttes de sérum de lapin antiglobuline humaine ou de chèvre antiglobuline de lapin, conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Ce sérum est utilisé à une dilution convenable, établie par un titrage préalable, et soumis à une adsorption sur poudre d'organes.

On laisse en contact pendant trente minutes à 37°C dans une chambre humide, puis on lave dans une solution saline tamponnée. On monte la préparation en recouvrant la coupe d'une goutte de glycérine tamponnée à pH 7 que l'on recouvre d'une lamelle.

La lecture se fait le plus rapidement possible au microscope à fond noir et en lumière ultraviolette. Les réactions positives, c'est-à-dire l'union spécifique entre l'antigène et l'anticorps correspondant, se traduisent par une fluorescence jaune-verte intense à l'endroit même de la colonie ou de l'épithélium bronchique de l'embryon de poulet.

On incorpore dans la série de coupes examinées un témoin négatif réalisé avec un sérum ne contenant pas d'anticorps anti-agent d'Eaton, et un témoin positif réalisé avec un sérum de référence.

C'est là une réaction sensible, un peu plus sensible que la réaction de déviation du complément (140). Elle l'est moins que l'hémagglutination indirecte, mais nous verrons plus loin que cette réaction présente des inconvénients qui réduisent son intérêt. D'une manière générale, les investigations faites chez des sujets présentant des PAP avec hémagglutinines froides permettent de retrouver des anticorps spécifiques avec une fréquence de 80 à 90 %, 84 % pour Kingston et collaborateurs (132). Cependant, dans de rares séries, cette fréquence est beaucoup plus faible : 34,8 % pour Thivolet, Sohier et collaborateurs (133). Mais ceci ne permet pas d'accuser la sensibilité de cette méthode qui est reproductible et spécifique. On a pu observer simultanément la présence d'anticorps anti-agent d'Eaton et d'autres anticorps viraux ainsi que l'ont rapporté Thivolet, Sohier et collaborateurs (133) (deux cas sur trente) et Cook et collaborateurs (29) (2 % des cas). Tout le monde s'accorde pour penser que cette coexistence correspond à une infection mixte ou successive, et n'est pas due à un défaut de spécificité.

Il s'agit d'une méthode très valable, d'une grande sensibilité, mais sa technique fort minutieuse en rend l'application difficile. Elle présente évidemment tous les inconvénients des réactions d'immunofluorescence, et il faut éliminer au maximum les fluorescences non spécifiques, mais elle présente également des inconvénients liés à la fabrication de l'antigène : il faut de grandes quantités d'oeufs et la coupe en série des poumons nécessite des manipulations délicates dont le rendement est assez faible (133).

3 - LA DEVIATION DU COMPLEMENT

De 1959 à 1962, on ne disposait que de l'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic des infections à Mycoplasma Pneumoniae. Chanock ayant réussi le premier la culture de l'agent d'Eaton sur milieux acellulaires obtient par repiquage en milieu liquide un antigène brut fixant le complément (20). Cet antigène fut très utilisé, en particulier par Forsyth (en 1965)(53), Griffin (en 1965) (61) et Mufson (en 1967) (96).

Mais cette technique se montrant moins sensible que l'immunofluorescence, d'autres auteurs essaient de la perfectionner et en 1965 Kenny met au point un antigène purifié lipidique (73) qui fut utilisé par Grayston

(60) en 1965, Alexander (1) et Foy (54) en 1966, Evans (48) en 1967, Copps (30) en 1968. En 1967, Sonerson et collaborateurs (121) préparent un antigène concentré par culture de Mycoplasma-Pneumoniae sur verre.

Des travaux plus récents ont permis une caractérisation plus poussée de cet antigène fixant le complément : sa solubilité dans les solvants organiques décrite par Kenny et Grayston (73), Prescott et collaborateurs (102) et Sobeslavsky et collaborateurs (103), en a fait soupçonner la nature lipidique. Puis Prescott et collaborateurs (104) ont montré qu'il s'agissait d'un haptène phospholipidique. Sobeslavsky et collaborateurs (103, 116) pensent que cet antigène est probablement un constituant externe de la membrane cellulaire de Mycoplasma Pneumoniae.

Trois types d'antigène sont utilisés :
- les antigènes bruts concentrés
- les antigènes purifiés lipidiques
- l'antigène complet obtenu par culture sur verre.

a) Les antigènes bruts concentrés

Le type en est l'antigène préparé par Chanock et ses collaborateurs en 1962 (20) à partir de la souche FH isolée par Liu (83). La composition du milieu de culture est celle que nous décrivons ci-dessous avec 1 % de dextrose qui assure une pousse plus rapide. Après une incubation de huit jours à 35°C en aérobiose, les suspensions sont concentrées par centrifugation à 40.000 tours pendant trente minutes et le culot est remis en suspension dans du tampon véronal à pH 7,2 au 1/50 ou au 1/100 du volume originel, et la préparation est chauffée une demi-heure à 56°C. Malgré ce traitement, un pouvoir anticomplémentaire persiste souvent; l'action du phénol pendant quatre jours à 35°C à la concentration finale de 0,5 % permet de le réduire. Il s'agit donc d'un antigène brut concentré, phénolé, appelé antigène B.

Récemment, des auteurs japonais (41) ont repris cette méthode en y apportant les modifications suivantes :

La culture en milieu liquide est soumise à une agitation horizontale permanente (131 mouvements par minute d'amplitude 4 mm); l'acidification du milieu qu'objective le virage du rouge de phénol est corrigé chaque jour

par addition de soude jusqu'à un pH de 7,8 du quatrième au neuvième jour. Après cinq à neuf jours d'incubation, on ajoute 0,5 % de phénol et la culture est encore incubée quatre jours à 37° sans l'agiter. La culture est ensuite chauffée une demi-heure à 56°C puis centrifugée à 8.000 tours/mn pendant soixante minutes. Le culot est remis en suspension au 1/20 du volume originel dans du tampon véronal. L'antigène ainsi obtenu a un titre élevé, il est très stable et sans pouvoir complémentaire. Après lyophylisation, on peut le conserver à +4°C pendant au moins 7 mois, et, réhydraté, il peut être conservé plus de six mois à -20°C.

Eng (46) en 1967, obtient par une technique voisine de celle de Chanock un antigène dont il réduit le pouvoir anticomplémentaire par séjour au bain-marie à 100° pendant trente-cinq minutes. De plus, le titre passe de 1/128 à 1/512. Cette méthode, décrite par Klieneberger-Nobel en 1962 (76) lui paraît beaucoup plus satisfaisante que la technique au phénol de Chanock.

De nombreux auteurs : Dowdle et collaborateurs en 1964 (35), Schieble en 1966 (106), Janson en 1964 (66), Clyde en 1963 (25) ont apporté de légères modifications à ces techniques de base; elles sont rapportées dans la thèse du Docteur Bosshard (11).

b) Les antigènes purifiés

En 1965 Kenny et Grayston (73) montrent que les antigènes de Mycoplasma Pneumoniae fixant le complément peuvent être extraits par les solvants organiques : chloroforme, éther, alcool éthylique, avec disparition du pouvoir anticomplémentaire. A partir de la souche AP 164, ils préparent un antigène brut bouilli nommé "B", et après extraction, les solvants sont évaporés et les résidus remis en suspension.

Kenny met alors au point une technique de purification des antigènes qui lui permet d'obtenir un antigène lipidique haptènisé, nommé "L", moins immunogène mais plus spécifique. A 5 ml d'antigène brut concentré 100 fois, il ajoute 100 ml de chloroforme et 50 ml d'alcool méthylique. Après agitation, le mélange est additionné de 37,5 ml de solution aqueuse de KCl à 0,1 M et vigoureusement agité. Dans un bain de glace, on voit se former deux

phases : une phase chloroformique et une phase d'eau et d'alcool méthylique. Le chloroforme étant évaporé, le résidu est reconstitué avec de l'alcool selon un volume étal à celui de l'antigène brut concentré. Cet antigène L, à raison d'une partie, est associé à trois parties d'une solution d'albumine bovine à 5 % dans du PBS (Phosphate Buffered Saline), ce qui assure sa stabilité et augmente légèrement son titre.

Travaillant avec un antigène L du type Kenny, l'équipe lyonnaise (11) apporte quelques variantes à sa préparation : pas de rouge de phénol dans le milieu de culture; après l'extraction, le résidu est repris dans un mélange d'une partie d'alcool éthylique absolu pour deux parties de PBS à pH 7,2; la stabilisation est assurée par une partie d'albumine bovine à 7,5 % pour une partie d'antigène. L'antigène ainsi obtenu se conserve parfaitement à +4° pendant trois mois.

L'antigène d'Offenhauer (97) est une variante de la technique de Kenny d'extraction par l'alcool. Evans (48) n'utilise pas d'agitateur et lave son culot dans du tampon véronal.

c) <u>L'antigène complet obtenu par culture sur verre</u> (121)

Somerson et collaborateurs préparent des suspensions concentrées de Mycoplasmes en utilisant la propriété qu'ont ces germes de pousser sur des surfaces de verre pour former une nappe continue et adhérente de colonies qui ne se détachent pas au cours des lavages. Ils utilisent la souche FH de Liu (83) qu'ils cultivent dans le milieu liquide de Chanock (20). Dans des bouteilles de Povitsky de deux litres, 500 ml de bouillon de culture sont inoculés avec $10^{9,7}$ CFU (unités formant colonies) de la souche du FH au 325ème passage. L'incubation se fait à 37°C, les bouteilles étant en position horizontale. Le virage du rouge de phénol met en évidence la pousse du germe ; l'incubation dure de deux à trois jours; généralement, les colonies forment une nappe confluente sur la surface du verre en quarante-huit heures. On rejette le milieu de culture et les colonies sont lavées trois fois avec du PBS 7,2 avant d'être remises en suspension par raclage dans 20 ml de PBS 7,2.

L'activité de cet antigène est augmentée si on détache les colonies par l'action de la trypsine à raison de 20 ml à 2,5 % pour 500 ml de milieu.

On laisse agir quinze à trente minutes, puis on neutralise la trypsine en mettant la suspension deux heures à 56°C. On centrifuge ensuite une heure à 8.000 tours et le culot est repris dans du PBS 7,2 à un volume égal au 1/25 du volume initial.

Pour Somerson, cette préparation n'est pas anticomplémentaire et présente une bonne activité antigénique.

Sohier et collaborateurs (11) ont utilisé cette technique en essayant différentes méthodes d'inactivation de la trypsine; le chauffage à 56°C pendant deux heures semble donner le plus régulièrement des antigènes non anti-complémentaires. Ils ont aussi tenté d'ultrasonner quelques-uns de ces antigènes et ces essais se sont montrés encourageants. Ils ont également fabriqué un antigène lipidique à partir d'une culture trypsinisée, antigène dépourvu de pouvoir anticomplémentaire mais utilisable à une dilution plus faible que l'antigène préparé à partir dè cultures en milieu liquide selon Kenny. Cet antigène complet est habituellement conservé à -20°C. Sohier et collaborateurs (11) ont fait des essais de conservation par lyophylisation, à -20°C, et à -50°C pendant quinze jours et six semaines. Dans tous les cas, les antigènes ont retrouvé leur titre et sont restés non anticomplémentaires.

Les méthodes utilisées sont des adaptations de la méthode de Kolmer classique. R. Sohier utilise une microméthode en tubes (11). Deux unités de complément et deux unités antigéniques sont engagées dans la réaction. Bradstreet et Taylor travaillent en plaques de plastique (13), le volume total n'étant que de 0,4 ml. Les globules rouges de mouton sensibilisés sont dilués à 2 % et dans la réaction, on utilise deux unités d'hémolysine.

Isao Ebisawa (41) utilise également une technique de Kolmer modifiée : les globules rouges de mouton sont ici à 1,5 % et sensibilisés avec trois unités d'hémolysine.

Quant à Kenny, il engage quatre unités antigéniques dans sa réaction avec deux unités de complément et deux unités d'hémolysine (73).

Dans tous les cas, la fixation se fait à +4°C pendant la nuit.

Les réactions de fixation du complément se sont toujours montrées un peu moins sensibles que l'immunofluorescence. Dès le début de leur expérimentation, Chanock a fait des titrages comparatifs (20) montrant que l'antigène fixant le complément était un réactif spécifique mais modérément sensible, sa sensibilité n'étant que 80 % de celle de l'immunofluorescence sur coupes d'embryon de poulet. D'autres auteurs ont également obtenu des résultats comparables (59, 140). Cette réponse en anticorps fixant le complément n'est pas fonction de la sévérité de l'infection, on l'observe aussi bien après une infection inapparente ou discrète.

La sensibilité et la spécificité de la réaction varient suivant l'antigène utilisé.

Kenny et Grayston ont comparé les résultats sérologiques obtenus en utilisant soit l'antigène lipidique, soit l'antigène brut bouilli ou extrait par l'éther (73). De faibles titres d'anticorps décelés chez les lapins ou les hommes par un antigène B ne sont pas décelés par l'antigène L, ce qui, pour Kenny, prouve la plus grande spécificité de ce dernier.

Offenhauer, en comparant l'antigène lipidique à l'antigène brut phénolé de type Chanock (97) arrive à des conclusions identiques.

Somerson compare son antigène obtenu par culture sur verre à l'antigène lipidique et à l'antigène brut phénolé (121). Il lui trouve une égale sensibilité, et appuie sa spécificité en montrant qu'il ne réagit avec aucun des cinq antisérums qu'il avait préparés contre des espèces de Mycoplasmes humains autres que Mycoplasma Pneumoniae.

Sohier rapporte aussi une étude comparative entre l'antigène lipidique type Kenny et l'antigène complet obtenu par culture sur verre selon la technique de Somerson (11). Les titres obtenus avec l'antigène complet sont supérieurs d'au moins une dilution à ceux obtenus avec l'antigène lipidique, et l'antigène complet détecte parfois une augmentation significative du titre des anticorps, que ne décelait pas l'antigène lipidique. L'antigène complet de Somerson apparaît donc plus sensible que l'antigène lipidique. Il est facile à préparer, permet la culture rapide d'une grosse quantité de microorganismes, leur concentration sans centrifugation; enfin, congelé à -20° ou lyophylisé, il se conserve bien.

Les anticorps déviant le complément apparaissent vers le septième jour après le début de l'infection, leur augmentation est rapide et significative et leur titre maximum est obtenu entre le septième et le trentième jour. Ce titre peut varier de 16 à 8192. Ils peuvent persister plusieurs mois, mais ce n'est pas constant.

Comme dans beaucoup d'autres affections bactériennes ou virales, un diagnostic de certitude ne peut être fait que si l'on observe l'augmentation significative des anticorps. Cependant, une baisse de titre observée dans les mois qui suivent l'infection, un titre élevé supérieur à 64, permettent un diagnostic de probabilité.

L'immunofluorescence, l'hémagglutination passive et les réactions d'inhibition de croissance permettent de titrer les anticorps "protecteurs"; la fixation du complément ne révèle que les anticorps "d'infection" ne persistant dans le sérum que pendant un temps limité, pouvant donc donner des informations sur la période à laquelle a évolué une infection. Le titrage de ces anticorps a donc un intérêt diagnostique (11). Pour certains, la fixation du complément est moins sensible que les autres réactions, mais malgré cela, elle conserve une grande valeur pratique : elle est simple, peut être utilisée dans tout laboratoire effectuant des réactions de fixation du complément pour d'autres diagnostics. Elle est facilement reproductible et de plus économique, car utilisable en micro-méthode, ce qui limite la consommation des stocks d'antigène et ne demande que des quantités réduites de sérum. Elle ne nécessite qu'un minimum de matériel.

Les antigènes se conservent bien, mais ils sont de préparation difficile; la difficulté est de les débarrasser du pouvoir anticomplémentaire fréquemment observé.

Il faut signaler aussi que les anticorps fixant le complément sont essentiellement des γ-globulines 19 S et seraient inactivés par absorption sur disque de papier filtre, ce qui rend impossible l'utilisation de cette technique pour le recueil et la conservation des échantillons de sérums (106).

4 - L'IMMUNODIFFUSION

Le test de précipitation par double diffusion en gélose, considéré comme insuffisamment sensible pour une mesure quantitative des anticorps, fut d'abord utilisé pour l'étude des relations antigéniques entre les différentes espèces de Mycosplasmes. Cette étude fut d'abord réalisée par Taylor, Robinson, Somerson, Turner, Chanock (124) qui eurent des difficultés à obtenir un antigène de Mycoplasma Pneumoniae satisfaisant; puis Taylor, Robinson, Chanock et Sobeslavsky (125) obtinrent un antigène de Mycoplasma Pneumoniae plus actif et précisèrent leurs études.

Ce n'est qu'en 1968 que R.M. Conant, Somerson et Senterfit (28) utilisèrent la méthode d'Ouchterlony pour détecter la présence et la montée des anticorps chez l'homme.

Le premier antigène de Mycoplasma utilisé (125) fut obtenu à partir d'une culture du mycoplasme en milieu liquide classique titrant 10^7 UFC/cm3. Après centrifugation, le culot est repris dans de l'eau distillée en le concentrant 800 fois. Cette suspension est congelée et décongelée dix fois ou traitée par les ultrasons. On peut la conserver à -20°C. Un bouillon non inoculé, traité de la même façon, permet de contrôler l'antigène préparé.

Plus récemment, des modalités différentes ont permis d'obtenir un antigène de meilleure qualité (28) : une suspension de 0,1 ml de Mycoplasma Pneumoniae de la souche FH est inoculée dans 25 ml de milieu contenu dans un flacon de 250 ml. Le flacon de culture est mis en position horizontale et incubé à 37°. Mycoplasma Pneumoniae pousse en une couche continue adhérente à la surface de verre du flacon (121), si bien qu'après quatre jours, le milieu de culture est éliminé. La couche de germes attachée au verre est lavée quatre fois avec 10 ml de tampon phosphate salin à pH 7,3; puis les germes sont détachés du verre par grattage et remis en suspension dans 0,4 ml d'eau distillée, enfin congelés et décongelés dix fois. Cet antigène peut être conservé six mois à +4°.

Les sérums humains ne sont pas inactivés par chauffage.

On peut préparer des anticorps chez le lapin (124) par injections sous-cutanées de suspensions de poumon d'embryon de poulet infecté, ou par injections intradermiques puis intrapéritonéales, d'une culture de Mycoplasma Pneumoniae dans un bouillon préparé à partir de chair de lapin et enrichi de sérum de lapin. Le titre du sérum est vérifié par le test d'hémagglutination indirecte.

La méthode utilisée est la technique d'Ouchterlony de double diffusion en gélose. On peut utiliser une micro-méthode (28) dans laquelle le milieu de diffusion est constitué par 0,6 % d'agarose préparé dans du NaCl 0,15 M (27). Quand on étudie un sérum humain, les cupules destinées à recevoir l'antigène et le sérum ont 4 mm de diamètre et reçoivent 45 µ l de réactif. Quand il s'agit de sérums d'animaux hyperimmunisés, les cupules ont un diamètre de 3 mm et une capacité de 25 µ l. Les cupules sont distantes de 2 à 3 mm.

Le tout est incubé à 33° en atmosphère humide. Quand les lignes de précipitation sont apparues, elles sont lavées en eau physiologique, séchées et colorées par le soudan noir et l'azocarmin B (139). Les procédés de coloration par le soudan noir pour les lipides et par une triple coloration pour les protéines sont décrits par Crowle (32).

Quand deux cupules voisines contiennent, l'une l'antigène Mycoplasma Pneumoniae et l'autre le sérum d'un convalescent infecté par Mycoplasma Pneumoniae, on observe l'apparition d'une ou de plusieurs lignes de précipitation après cinq à seize heures d'incubation, et on a pu démontrer qu'une bande au moins était commune à tous les sérums positifs des malades étudiés. Cette ligne commune est colorée par les colorants des lipides et ceux des protéines, l'antigène qui entre en jeu dans cette réaction est donc certainement une lipoprotéine, tandis que les autres lignes de précipitation ne sont colorées que par les colorants des protéines. La comparaison des résultats obtenus par diffusion en gélose et par inhibition de réduction du tétrazolium a permis d'établir une bonne corrélation entre les deux méthodes, une montée d'anticorps en inhibition de réduction du tétrazolium correspond à l'apparition d'une ou plusieurs lignes de précipitation en gélose.

En général, la réaction de précipitation par double diffusion en gélose est considérée comme insuffisamment sensible pour réaliser un titrage d'anticorps. Or, Conant, Somerson et Senterfit (28) ont obtenu des résultats remarquables concordant avec les résultats d'inhibition de réduction du tétrazolium. Les taux des réponses immunitaires des sujets naturellement infectés et des vaccinés donnés par cette réaction montrent que la double diffusion en gélose est un moyen sensible de détection des anticorps anti-Mycoplasma Pneumoniae; mais cette sensibilité est bien sûr conditionnée par la qualité de l'antigène préparé. Cette sensibilité pourrait être encore accrue par le phénomène de la "stimulation" (32) qui s'observe quand on met un sérum très positif dans la cupule voisine d'un sérum suspect d'avoir un bas niveau d'anticorps.

Certains ont pensé que les lignes observées pourraient correspondre à une micro-agglutination plutôt qu'à une précipitation (28, 27). Jusqu'à présent, la nature physique de l'antigène intervenant n'a pas été établie et le problème reste posé.

La spécificté de cette méthode est démontrée par le fait que l'antigène préparé à partir de Mycoplasma Pneumoniae ne réagit pas avec un sérum préparé contre une autre espèce de mycoplasme humain (28). Les antigènes des différentes espèces de mycoplasmes humains et animaux furent préparés dans les mêmes conditions de culture (Mycoplasma Hominis, Mycoplasma Orale type I, Mycoplasma Fermentans, Mycoplasma Salivarium, Mycoplasma Pneumoniae, Mycoplasma Gallisepticum, Mycoplasma Pulmonis). Tous précipitaient avec un immunsérum homologue de lapin, et, sauf pour Mycoplasma Pneumoniae, aucun ne précipitait avec un sérum humain dont on avait montré auparavant qu'il réagissait avec l'antigène standard de Mycoplasma Pneumoniae. Les composants du milieu de culture, y compris le sérum et l'extrait de levure, furent testés et ne donnèrent aucune réaction avec le sérum humain.

Comme par ailleurs on pense que Mycoplasma Pneumoniae comprend une fraction antigénique ressemblant à la cardiolipine (80), on l'a testé contre dix sérums donnant une réaction de Bordet Wasserman positive, mais on n'a obtenu aucune ligne de précipitation.

On a de même observé des résultats négatifs avec des sérums provenant de sujets apparemment non atteints d'infections à Mycoplasma Pneumoniae (28). Des antigènes furent préparés à partir d'autres souches que la souche FH, notamment à partir des souches PI 1428 et DC 65-2053 (28, 62); ils permirent d'observer des réactions semblables à celles obtenues avec l'antigène standard. Malgré quelques variations dans le nombre des lignes de précipitation, la ligne commune était toujours présente. Cette méthode apparaît donc comme très spécifique, et, très tôt, elle a permis de montrer que Mycoplasma Pneumoniae est complètement distinct des autres mycoplasmes humains du point de vue antigénique (124).

La réaction de précipitation en gélose nécessite la mise en présence d'antisérums puissants et d'antigènes concentrés, et il est particulièrement difficile d'obtenir un antigène satisfaisant. D'autre part, la température doit être stable pour éviter l'apparition d'artéfacts. Par contre, cette réaction a l'avantage d'être facile à réaliser, rapide, et de ne pas être à la merci de contaminations bactériennes ou d'inhibiteurs non spécifiques parfois contenus dans les sérums.

5 - L'HEMAGGLUTINATION INDIRECTE OU PASSIVE

La réaction de fixation du complément, bien que plus pratique, n'étant pas aussi sensible que l'immunofluorescence, Dowdle et Robinson (35) ont adapté au diagnostic de Mycoplasma Pneumoniae un test d'hémagglutination indirecte (= HI) selon le principe de Boyden (12) : les globules rouges de mouton traités par l'acide tannique adsorbent les antigènes extraits par action des ultrasons d'une culture de Mycoplasma Pneumoniae. Les hématies deviennent alors agglutinables en présence de l'antisérum spécifique. Par dilution, on peut établir le titre des anticorps.

Dowdle et Robinson préparent un antigène valable pour la fixation du complément et l'hémagglutination. 100 ml de bouillon sont inoculés avec la totalité d'une culture vieille de trois à quatre jour en boîte de pétri (de 60 mm de diamètre) et incubés quatre à cinq jours à 35°C. On réalise un

deuxième passage dans un bouillon frais avec un inoculum à 10 % qui titre 10^3 à 10^4 colonies/ml. Après incubation de quinze jours à 35°, le volume est réduit au 1/5 du volume originel par dialyse contre polyéthylène glycol, puis la culture est centrifugée à 30.000 tours/mn dans une ultracentrifugeuse pendant une heure. Le culot est repris dans un volume de PBS 7,2 égal à la moitié du volume du bouillon initial. On centrifuge à nouveau à 20.000 tours/mn pendant une heure et cette fois, le culot est remis en suspension dans du tampon PBS pour obtenir un volume final égal au 1/20 du volume du bouillon initial. Cette suspension est ultrasonnée pendant 10 minutes à 9 kilocycles.

Les globules rouges de mouton en solution d'alsever sont lavés trois fois avec du PBS, ajustés à la concentration finale de 2,5 % et mélangés avec un volume égal d'une solution fraîchement préparée d'acide tannique dilué au 1/20.000 dans du PBS. Après incubation de dix minutes à 37°C, on centrifuge et on lave une fois dans du PBS. Le culot est remis en suspension à 2,5 % dans du PBS pH 6,4.

Un volume d'antigènes extraits par ultrasons est mélangé à un volume de la suspension à 2,5 % de globules rouges tannés et ce mélange est mis dans quatre volumes de PBS 6,4.

Le tout est incubé trente minutes à la température du laboratoire, puis les globules sensibilisés sont lavés deux fois dans du sérum de lapin adsorbé avec des hématies de mouton et dilué au 1/150 dans du PBS. Ils sont finalement mis en suspension à 0,5 % dans ce même sérum de lapin dilué. La concentration de l'antigène à utiliser pour la sensibilisation des globules est déterminée par titrage d'un sérum de cheval hyperimmunisé. La plus haute concentration d'antigène donnant le plus haut titre de l'immunsérum spécifique est considéré comme l'optimum (c'est habituellement une dilution au 1/32 ou au 1/64).

Les globules tannés et sensibilisés peuvent être congelés en ampoules scellées selon la technique de Hubert et collaborateurs (64), conservés à -70° et décongelés quand nécessaire.

Tous les sérums (35) utilisés sont inactivés par un chauffage à 56° pendant trente minutes et dilués au 1/10 dans le sérum de lapin adsorbé et dilué. Avant la réaction ils sont adsorbés à 4° pendant trente minutes avec 0,1 ml de globules rouges à 50 % par ml de sérum dilué.

On peut préparer des antisérums spécifiques de cheval par injections intraveineuses de l'antigène de Mycoplasma Pneumoniae lavé.

Dowdle et Robinson (35) utilisent, avec des modifications minimes, la méthode recommandée par Stavitsky (122).

Les solutions de PBS à pH 7,2 et à pH 6,4 sont préparées en mélangeant du NaCl 0,3 M avec des volumes égaux des tampons Na_2 H PO_3, KH_2 PO_4 0,15 M préparés selon Stavitsky (122).

Les suspensions finales des globules sensibilisés et toutes les dilutions de sérum sont faites dans du sérum de lapin inactivé par chauffage, adsorbé avec des globules rouges de mouton à 50 %, et dilué au 1/150 dans du PBS (= diluant sérum de lapin).

Les sérums à titrer préalablement traités, sont dilués de deux en deux dans 0,4 ml du diluant sérum de lapin. On ajoute un volume égal de globules rouges sensibilisés à 0,5 % et on incube à 35°C. Parallèlement, on réalise trois séries de témoins :

1) Les trois premières dilutions de chaque sérum sont testées avec des globules traités seulement par l'acide tannique; ils ne doivent pas être agglutinés.

2) Un mélange des globules rouges sensibilisés et du diluant ne doit pas être agglutiné.

3) Un témoin positif est constitué par le titrage complet de l'immunsérum de cheval de référence anti-Mycoplasma Pneumoniae. On doit retrouver le titre indiqué.

La lecture se fait quand les deux premières séries de témoins montrent des culots bien formés, ce qui demande en général deux à trois heures.

Le titre du sérum en anticorps est donné par l'inverse de la plus haute dilution permettant d'observer une agglutination franchement positive des globules sensibilisés.

Dowdle a fait des études comparatives de l'H I, la fixation du complément (FC) et l'immunofluorescence sur colonie (19).

L'H I s'est montrée beaucoup plus sensible que l'immunofluorescence et d'une sensibilité comparable à celle de la fixation du complément. Ces deux méthodes sont en accord sauf dans deux cas où les sérums précoces et tardifs révélaient une montée d'anticorps en FC alors qu'ils avaient un titre élevé stationnaire en H I. C'est donc une méthode aussi sensible que la FC pour le diagnostic des infections récentes, et peut-être plus sensible pour la détection d'anticorps préexistants (35).

Sohier a comparé l'hémagglutination passive à la fixation du complément avec l'antigène lipidique de Kenny (122). Dans ses conditions techniques, l'H I s'est révélée beaucoup moins sensible que la fixation du complément. Mais il est en contradiction avec Dowdle et Robinson etTaylor-Robinson pour lesquels l'H I est autant ou plus sensible que la fixation du complément.

La spécificité a également été étudiée et démontrée par Dowdle (35) par application de l'H I au titrage de sérum de cheval homologue et de sérums humains à titre élevé. Il a montré que l'hémagglutination pouvait être inhibée par des dilutions variables d'antigène de Mycoplasma Pneumoniae, mais pas par des antigènes de deux souches humaines sauvages de PPLO préparés de la même manière que Mycoplasma Pneumoniae. L'H I a également été pratiquée sur des sérums provenant de malades ayant fait des maladies respiratoires d'étiologie autre que Mycoplasma Pneumoniae. On n'a observé aucune montée d'anticorps; mais les titres stationnaires n'étaient pas rares, 1/3 des malades au moins ont un certain titre d'anticorps; ce résultat s'accorde avec ceux obtenus auparavant par immunofluorescence (29, 24).

L'H I est donc une méthode immunologiquement spécifique et sensible.

Dowdle et collaborateurs, dans une étude ultérieure (36) trouvent un pourcentage plus élevé de positifs par H I que par FC, ce serait alors la technique de choix pour déceler l'état de protection, mais la spécificité de

la réaction est discutée par Taylor-Robinson qui suggère qu'une réaction positive à titre faible, 10 par exemple, n'est pas complètement spécifique de Mycoplasma Pneumoniae. Bien qu'il observe un plus grand nombre de sérums positifs par H I que par inhibition de réduction du tétrazolium, il pense que les anticorps détectés par les deux réactions sont différents; les antigènes ultrasonnés engagés dans la réaction d'H I ne sont pas seulement des antigènes de surface.

Cette méthode présente des avantages techniques sur la FC et sur l'immunofluorescence : elle est complètement réalisable en un jour, et ne demande pas un équipement coûteux pour les laboratoires qui ne pratiquent pas très souvent la sérologie de Mycoplasma Pneumoniae; les globules rouges tannés et sensibilisés peuvent être conservés sans que l'on soit obligé d'en préparer pour tester quelques sérums.

Cependant, au cours de l'infection par Mycoplasma Pneumoniae, la montée des anticorps décelés par l'H I est précoce et un titre élevé est atteint dès la phase aiguë de la maladie, ce qui rend difficile le constat de la montée des anticorps et peut priver d'un argument diagnostique de plus grande valeur que la simple observation d'un titre élevé mais stable.

Par contre, sa grande sensibilité en fait un test de choix pour déceler l'état de protection, en particulier dans le but d'apprécier la séroconversion qui suit l'administration d'un vaccin.

Le test d'agglutination au Latex a été expérimenté par Meir Kende (72). Morton montre en 1966 que des Mycoplasmes peuvent être adsorbés sur des particules de latex qui deviennent alors agglutinables par un antisérum spécifique.

Ce test est inutilisable chez l'homme dont le sérum contient des agglutinines non spécifiques, mais il est utile chez l'animal pour apprécier le pouvoir immunogène d'un vaccin.

6 - L'AGGLUTINATION SPECIFIQUE

En 1964, Kerr et collaborateurs décrivent un test d'agglutination sur lame traduisant l'union spécifique antigène-anticorps de Mycoplasma Pneumoniae (74).

Une culture de Mycoplasma Pneumoniae sur milieu "C" de Olson est récoltée après quatre à cinq jours d'incubation à 37° et ultrasonnée, puis colorée avec une solution de fuschine basique alcoolique à 1 %.

Sur une lame de verre, une anse de sérum est mélangée à une goutte d'antigène au 1/30. L'agglutination spécifique est visible microscopiquement en une à trois minutes.

Des sérums de convalescents de pneumonie atypique et des sérums de lapins de référence anti-Eaton agglutinent l'antigène ainsi préparé. Cette méthode simple et rapide ne connaît actuellement qu'une application qualitative.

7 - INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

En 1965, Feldman et Suhs ont démontré l'existence d'une hémagglutinine dans les cultures vivantes de Mycoplasma Pneumoniae (50); l'observation originale en a été faite alors qu'ils tentaient de démontrer la présence d'hémolysines pour diverses sortes de globules rouges dans un bouillon de culture de Mycoplasma Pneumoniae.

Cette hémagglutinine, active sur les globules rouges de Vervet, d'homme ou de lapin, se manifeste en présence d'agglutinines naturelles pour les globules utilisés; celles-ci sont apportées par du sérum de cheval décomplémenté incorporé à raison de 30 % dans les diluants.

Récemment, en 1969, John et collaborateurs ont cependant démontré l'existence d'une hémagglutination directe pour Mycoplasma Pneumoniae, réalisée en l'absence de sérum de cheval (71).

Le milieu de culture utilisé pour l'obtention de l'antigène est le milieu classique de Hayflick, mais le sérum de cheval non chauffé est agammaglobulinique et l'indicateur de pH est du rouge crésol alcalin à 0,4 %

à raison de 0,1 ml pour 100 ml; le virage se fait à un pH de 7,1 à 7,2 compatible avec la survie des germes, et ceci permet de repiquer une culture vivante.

A partir d'une culture en bouillon de quatre jours, on fait une dilution au 1/320 et on en inocule 0,1 ml dans un tube de milieu neuf qu'on incube à 37° en aérobiose. Le virage se produit en 48 à 96 heures.

Feldman et Suhs ont montré qu'il fallait absolument une culture vivante (50). L'apparition de l'hémagglutinine suit la multiplication du mycoplasme et tombe brusquement après l'atteinte du titre maximum. Il faut donc la récolter quand le titre est à son maximum. L'antigène peut être stocké indéfiniment à -65°C. De même, l'incorporation au milieu d'agents destructeurs comme le merthiolate, la formaldéhyde ou le phénol, altèrent ou détruisent l'hémagglutinine.

Les sérums sont inactivés par un chauffage à 56°C pendant trente minutes avant leur titrage. Ils contiennent en effet des inhibiteurs non spécifiques pouvant donner des titres au 1/256 et non éliminés par le kaolin mais détruits à chaud. Ce système labile résiste à des congélations et décongélations répétées et ne semble pas être le complément hémolytique.

Les dilutions sont faites dans du PBS pH 7,2 ou dans du PBSG, c'est-à-dire avec 0,2 % de gélatine (Difco). Quand on ajoute du sérum de cheval (HS - PBSG), il est d'abord inactivé à 56° pendant trente minutes. Ce sérum doit contenir des hémagglutinines pour les globules employés dans le système révélateur.

On prend des globules rouges de Vervet, d'homme ou de lapin. Le sang frais est mélangé à un volume égal de solution d'Alsever modifiée et ce mélange est conservé à +4°C jusqu'à utilisation. A ce moment-là, une partie en est prélevée, lavée trois fois dans du PBS, et mise en suspension à 10 % dans ce même duluant; elle peut être ainsi conservée une semaine à +4°C. Juste avant utilisation, elle est diluée à 0,1 % dans du PBSG.

Les réactions se font dans des petits tubes de verre ou en plaques, ce qui est plus rapide; un micro-titrage est possible.

a) On procède d'abord au titrage de l'hémagglutinine :

- La culture, c'est-à-dire l'antigène, est rapidement décongelée au bain-marie à 37°.
- L'antigène est alors dilué au 1/5 dans du HS-PBSG constitué de :
  - PBSG à pH 7,2
  - Gélatine Difco à 0,2 %
  - Sérum de cheval inactivé à 30 %

  et abandonné à la température ambiante de une heure à une heure trente.
- On fait ensuite des dilutions de deux en deux dans le même diluant (HS - PBSG) (sous un volume de 0,25 ml si on travaille en plaque).
- A chaque dilution, on ajoute un volume égal de globules rouges en suspension à 0,1 % dans du PBSG.
- La lecture est faite trois heures après, la sédimentation étant complète dans les témoins globules. Une unité hémagglutinante (= UHa) correspond à la plus haute dilution permettant d'observer une agglutination de quatre croix.

Les globules humains donnent un titre plus bas et les globules de lapin un titre plus élevé que ceux de Vervet.

Une fois le titrage fait pour un antigène, il est seulement vérifié chaque semaine.

b) On réalise ensuite le test d'inhibition d'hémagglutination avec deux unités hémagglutinantes par dilution.

- On fait des dilutions du sérum à étudier dans du HS-PBSG (sous un volume de 0,125 ml si on opère en plaque).
- Sous un volume égal, on ajoute 8 UHa, diluées dans le même diluant, à chaque dilution de sérum.
- On laisse trente minutes à la température ambiante.

- On ajoute ensuite un volume égal de globules à 0,1 %.
- La lecture se fait après trois heures ou quand les témoins globules ont sédimenté.

Le titre du sérum est donné par la plus haute dilution permettant d'observer moins de deux croix. Si on laisse toute la nuit, la limite peut être un tube plus haut, mais les résultats tendent à être quelque peu irréguliers.

Pour travailler en micro-méthode, il faut apporter quelques modifications à ce qui vient d'être dit :

- La gélatine gêne les mélanges, l'antigène et les sérums sont donc simplement dilués dans du HS-PBS.
- Il faut une concentration plus forte de globules rouges : 0,2 %. Ils sont aussi mélangés à 0,4 % de gélatine, la concentration finale de cette dernière est donc égale à celle du macrotest.

Un certain nombre de facteurs conditionnent l'hémagglutination et ont été étudiés par Feldman et Suhs (50) :

- La température : les résultats sont bons, que le test soit incubé à 37°C ou à la température ambiante, mais la réaction ne se fait pas à 4°.
- La gélatine accélère la vitesse de sédimentation des globules rouges quand elle est ajoutée au PBS à raison de 0,2 %.
- Le sérum de cheval : on a constaté que l'hémagglutination optimum était obtenue quand le PBSG contenait 30 % de sérum de cheval inactivé par un chauffage de trente minutes à 56°C. L'étude de ce sérum a montré qu'il contenait des agglutinines pour les globules rouges de diverses espèces, y compris ceux de vervet, de lapin et d'homme. Elles sont détruites par le 2 Mercaptoéthanol (138). Le sérum de cheval agammaglobulinique ne les contient pas, c'est pourquoi on l'emploie dans le milieu de culture.

Feldman et Suhs avaient émis l'hypothèse que l'hémagglutination des globules rouges de vervet par Mycoplasma Pneumoniae dépendait de l'adsorption d'anticorps hétérologues antiglobules sur les globules rouges avant leur mélange avec l'antigène. Cette sensibilisation des globules rouges pouvait

altérer leur surface d'une certaine manière, ou les hétéro-agglutinines pouvaient servir de pont entre les globules et les Mycoplasmes.

John et collaborateurs (70) ont poursuivi l'étude de ce phénomène et ont montré que par la combinaison de deux antigènes, chacun à une concentration subagglutinante, on obtient une "hémagglutination cumulative". Cette dernière requiert que les deux composants soient des agglutinines. Ayant démontré l'existence d'une hémagglutination directe par Mycoplasma Pneumoniae (71), ils prouvent que c'est par ce mécanisme d'hémagglutination cumulative que le sérum de cheval du diluant permet d'obtenir des titres élevés d'hémagglutination.

Ils démontrent également que des anticorps contre l'un des deux antigènes (mycoplasma Pneumoniae ou sérum de cheval) inhibent l'hémagglutination.

Si cette méthode présente plusieurs avantages, à savoir qu'elle permet l'examen simultané et rapide d'un grand nombre de sérums et de manière reproductible, que les anticorps qu'elle décèle persistent très longtemps, elle présente un inconvénient majeur qui doit la faire rejeter dans les études épidémiologiques : comme nous l'avons dit, des anticorps contre l'un des deux antigènes inhibent l'hémagglutination. Des sujets ayant eu des injections de sérum de cheval dans le passé peuvent montrer une activité inhibante dans leur sérum. Ceci pourrait faire conclure à la présence d'anticorps anti-Mycoplasma Pneumoniae alors qu'il faudrait incriminer les anticorps antisérum de cheval.

Depuis peu (71), John et ses collaborateurs ont décrit une méthode beaucoup plus simple qui ne présenterait pas ces inconvénients. Une culture en suspension agitée ayant un titre élevé au 4ème jour hémagglutine directement à 20 ou 37° les globules rouges de cobaye dilués à 0,2 % dans du sérum physiologique. Il est possible de titrer les anticorps spécifiques inhibant cette hémagglutinine après élimination des inhibiteurs non spécifiques par inactivation préalable des sérums. Les dilutions sériques et les quatre unités hémagglutinantes sont incubées une heure à la température de la pièce avant distribution des globules rouges de cobaye.

Il est pour l'instant difficile de préciser les limites de la sensibilité et de la spécificité de cette méthode, car elle n'a pas été étudiée en parallèle avec les autres techniques.

8 - REACTION DE NEUTRALISATION OU D'INHIBITION DE CROISSANCE

Dès 1944, Eaton et collaborateurs (38, 84) avaient montré l'existence d'anticorps neutralisants pour l'agent d'Eaton dans les sérums de convalescents de pneumonie atypique primitive par épreuve sur l'animal sensible : le rat du coton. Mais cette technique longue et coûteuse ne permet pas des titrages en série.

En 1954, Edward et Fitzgerald les premiers (44) ont décrit une technique d'inhibition de la croissance de PPLO par un antisérum.

Bayley et collaborateurs (6, 7) décrivent une technique d'inhibition de croissance des mycoplasmes isolés de lignées de cultures cellulaires et de prélèvements génitaux humains. A une culture jeune, ils ajoutent à volume égal le sérum anti-spécifique, et après quarante-huit heures d'incubation à 37°, procèdent à une numération des germes par numération des colonies obtenues sur gélose. Par ce procédé, ils apprécient une inhibition de la croissance de 50 % ou plus. Ils démontrent que l'élément inhibiteur est une globuline non dialysable, insoluble dans l'eau, qui peut être dissociée du complexe antigène-anticorps par les ultrasons et réengagée dans des réactions d'agglutination du même mycoplasme. Ce dernier est également récupéré viable, ce qui exclut donc une action lytique de l'anticorps : l'action inhibitrice de croissance de l'anticorps serait due à une union de l'anticorps avec un antigène de surface.

A) Réactions d'inhibition de croissance révélées sur milieu solide par des disques de papier filtre imprégnés d'antisérum

Récemment, Clyde (26) modifiant la technique décrite par Huijmans, Evers et Ruys en 1956 (65), a montré que sur milieu solide une culture abondante de Mycoplasma Pneumoniae est inhibée spécifiquement par la présence de l'antisérum correspondant apporté au moyen d'un disque de papier imprégné de sérum.

Le mycoplasme est cultivé dans le milieu classique de Chanock.

Les sérums de convalescents et d'animaux hyperimmunisés ne nécessitent aucun traitement préalable.

La réaction est réalisée en boîte de pétri de dix centimètres contenant du PPLO Agar. Les boîtes sont placées ouvertes pendant une heure à 37°C dans un incubateur pour déshydrater la surface du milieu. Puis chaque boîte est inoculée avec 0,1 ml de culture de mycoplasme en bouillon en phase de croissance. Des disques de papier stérile de 6 mm (du type utilisé pour les antibiogrammes) sont imprégnés de 0,025 ml de sérum non dilué et pressés sur la surface de la gélose inoculée.

Après une incubation de quatre jours, les colonies sont visibles et l'examen à un faible grossissement permet d'apprécier autour des disques une zone d'inhibition de 3 à 7 mm de large d'où les colonies sont absentes. Dans chaque boîte, un témoin constitué par un disque imprégné de sérum normal de lapin n'entraîne aucune inhibition. Clyde a précisé certains facteurs influençant l'inhibition de croissance des Mycoplasmes par un antisérum : l'épaisseur du milieu solide et les conditions de conservation des antisérums sont sans effet. Par contre, le diamètre de la zone d'inhibition dépend de la richesse de l'inoculum. En pratique, le facteur le plus important est le rapport entre le nombre de germes présents et la concentration de l'antisérum.

Clyde a également réalisé une étude sur le rôle de l'âge de la culture en appliquant les disques d'antisérum après des durées d'incubation variables. La taille des zones d'inhibition est la même, que les disques soient placés 0,4 ou 8 heures après l'inoculation, mais elle baisse de 25 % 24 heures après et de 50 à 85 % 48 heures plus tard. Après maturation des colonies, l'application des disques ne provoque pas leur dissolution.

La spécificité de cette technique a été étudiée par Clyde (26) sur 8 souches de mycoplasmes et leurs antisérums homologues. Il a montré que Mycoplasma Pneumoniae était inhibé par son antisérum homologue alors qu'il n'y avait aucune inhibition par des antisérums hétérologues ni un sérum normal de lapin. Il s'agit donc d'une méthode hautement spécifique pour l'identification, beaucoup plus que la fixation du complément comme l'ont montré des études parallèles de ces deux techniques.

Sa sensibilité a été étudiée par dilution de deux en deux de l'antisérum. Les disques, saturés avec chaque dilution, sont appliqués sur des boîtes fraîchement inoculées avec Mycoplasma Pneumoniae. On constate que le diamètre de la zone d'inhibition est directement proportionnel à la concentration de l'antisérum. Une dilution sérique correspondant à 64 unités d'anticorps fixant le complément est la dilution limite produisant une zone d'inhibition.

Cette méthode très simple, de lecture macroscopique, permet l'identification des Mycoplasmes après isolement. Mais, si elle permet une bonne étude qualitative précise, elle ne permet pas une bonne étude quantitative : elle est beaucoup moins sensible que la fixation du complément par exemple pour la détection et l'étude quantitative des anticorps sériques.

B) Numération des colonies révélée par hémolyse

Warren en 1942 (143) et Edward en 1950 (42) ont montré que certaines espèces de Mycoplasmes hémolysaient les globules rouges de cheval ou de lapin alors que les autres ne le faisaient pas. Edward (43, 45) et Freundt (55) trouvèrent ces propriétés utiles pour classer les diverses espèces de PPLO d'origine humaine et animale. Récemment, en 1962, Freundt (56) montre que Mycoplasma Pneumoniae hémolyse les globules rouges de cheval, et en 1963, Somerson et collaborateurs (118) montrent que ce germe hémolyse les globules de cobaye et d'homme aussi bien que ceux de cheval.

La production d'une hémolyse complète de type β des globules rouges de cobaye permet de différencier le germe des autres PPLO (118, 25) et fournit une méthode simple et quantitative qui permet la numération des colonies de Mycoplasma Pneumoniae. Cette méthode a été utilisée par Jensen (68) pour révéler l'inhibition de croissance et titrer les anticorps sériques qui en sont responsables.

L'antigène est constitué par une souche de Mycoplasma Pneumoniae cultivée dans le milieu liquide classique de Chanock; il est titré et dilué de façon à obtenir 50 unités formant colonies par boîte de pétri recevant un inoculum de 0,1 ml.

Les globules rouges de cobaye et de mouton donnent une hémolyse complète, tandis que ceux de cheval, d'homme ou de lapin ne sont qu'incomplè-

tement hémolysés. Dans la réaction, on utilise des globules rouges de cobaye (118) qui sont recueillis dans une solution d'Alsever. Ils sont lavés trois fois dans une "solution saline" à 0,85 % avant d'être ajoutés au milieu complet "Difco PPLO Agar" enrichi et maintenu à 55°C pour obtenir une concentration finale de 3 % de globules. Ce mélange globules rouges - Agar est ensuite coulé sur les boîtes de gélose à la surface desquelles ont poussé les colonies selon une couche mince dont l'épaisseur doit être bien précise (3 ml pour une boîte de 5 cm de diamètre). Ces boîtes doivent être entre le septième et le quinzième jour de culture pour qu'un maximum d'hémolysine puisse être mis en évidence.

La culture de mycoplasme est diluée de façon à obtenir 100 colonies dans un volume de 0,1 ml. Le sérum à titrer est décomplémenté et dilué en série. On mélange 0,1 ml de chaque dilution de sérum à 0,1 ml de dilution de culture. 0,1 ml de chacun de ces mélanges est inoculé à la surface d'une boîte de gélose de 5 cm de diamètre (milieu solide classique pour mycoplasme).

Une boîte témoin est inoculée avec 0,1 ml d'un mélange de 0,1 ml de dilution de culture et 0,1 ml de diluant. On doit obtenir 50 colonies sur cette boîte témoin. On incube à 36° et, dans un deuxième temps, le septième jour, on coule en surcouche sur chaque boîte 3 ml du mélange milieu complet gélosé globules rouges de cobaye à 3 %. On incube à nouveau à 36° et on observe les boîtes tous les jours. Les colonies sont faciles à compter du fait de leur halo d'hémolyse bien visible à l'oeil nu. Le titre final du sérum est donné par la dernière boîte où 90 % des colonies ont été inhibées.

Il s'agit d'une méthode très spécifique qui, d'après Jensen, donne des titres parallèles à ceux obtenus par l'immunofluorescence indirecte et la déviation du complément.

La préparation des boîtes est longue et fastidieuse mais, une fois réalisée, elle permet une lecture facile, macroscopique et précise. Elle n'a pu être utilisée de façon extensive malgré sa spécificité et sa précision car c'est une technique trop délicate pour être mise entre toutes les mains, et trop longue.

C) Inhibition de croissance révélée par inhibition de réduction du tétrazolium

En 1965, Kraybill et Crawford (77) montrent qu'une culture abondante de Mycoplasma Pneumoniae réduit le chlorure de 2, 3, 5 Triphényl tétrazolium (TTC) incorporé à raison de 0,02 % dans le bouillon, avec apparition en trois à cinq jours d'une coloration rouge dans des conditions d'aérobiose.

En milieu solide, le TTC à même concentration est incorporé dans la gélose : un fragment d'Agar porteur de nombreuses colonies, renversé à sa surface, provoque l'apparition d'une couleur rose qui diffuse dans le bloc d'inoculation après trois à six jours d'incubation en aérobiose, les boîtes étant simplement closes à la paraffine. Les autres mycoplasmes humains ne réduisent le TTC qu'en anaérobiose seulement. Seul Mycoplasma Laidlawi possède le même pouvoir réducteur, c'est dire que ce test peut être utilisé pour l'identification de Mycoplasma Pneumoniae, mais en tenant compte de l'origine de la culture, du prélèvement pathologique qui est à sa source. Seul Mycoplasma Pneumoniae peut être isolé du tractus respiratoire.

L'année suivante, Senterfit et Jensen (107) à la recherche d'une technique de titrage des anticorps moins laborieuse que les précédentes, basées sur la numération des colonies, montrent que la présence de l'antisérum spécifique inhibe le métabolisme du germe et empêche la réduction du tétrazolium. L'hémolysine de Mycoplasma Pneumoniae est un peroxyde et Somerson pense que la production d'hémolysine et la réduction du tétrazolium vont de pair (120).

Mycoplasma Pneumoniae est cultivé dans le milieu classique de Chanock avec glucose. Une solution aqueuse de chlorure de 2, 3, 5 Triphényl-tétrazolium préparée et conservée à l'abri de la lumière, est ajoutée immédiatement avant usage à la concentration finale de 0,05 %. Une unité TTCR, c'est-à-dire la plus grande dilution de culture entraînant un changement de couleur après une période d'incubation d'une dizaine de jours à 37° et à l'obscurité, est employée comme inoculum dans le test.

Tous les sérums sont chauffés trente minutes à 56°C avant le test.

Le sérum à titrer est dilué en série de deux en deux dans 0,025 ml de milieu standard. On ajoute ensuite 0,175 ml d'une dilution de culture en bouillon calculée pour contenir une unité TTCR. Un témoin sérum positif et un témoin sérum négatif sont inclus dans chaque titrage. L'incubation se fait à 37° dans le noir pour éviter une photoréduction du tétrazolium. La lecture est faite habituellement le sixième jour quand les titrages parallèles de l'inoculum indiquent qu'une unité TTCR est présente dans le test.

On a constaté qu'un sérum normal de cobaye chauffé à 56° pendant trente minutes et ajouté au milieu à des concentrations de 2 à 10 % augmente les titres en anticorps d'antisérums variés de deux à seize fois par rapport aux titres obtenus sans sérum de cobaye. Le même effet est obtenu avec des sérums de lapin, de hamster, de singes et de quelques hommes. On ajoute donc habituellement 5 % de sérum de cobaye inactivé au milieu de culture de base. Cette action du sérum s'observant après chauffage, un effet du complément est apparemment éliminé. Cependant, il est possible que certains composants thermostables se soient attachés aux germes, les rendant plus sensibles à l'action des anticorps inhibiteurs du métabolisme.

Senterfit et Jensen (107) titrent parallèlement les anticorps anti Mycoplasma Pneumoniae par deux autres sérologies : la fixation du complément et l'inhibition de l'hémagglutination, et constatent les faits suivants :

Avant vaccination, des sérums de lapin contiennent fréquemment un faible titre d'anticorps fixant le complément ou inhibant l'hémagglutination et rarement des anticorps inhibant la réduction du tétrazolium; après vaccination, les titres inhibant la réduction du tétrazolium sont plus élevés que les titres fixant le complément.

Ces triples études sérologiques sont faites avant et après vaccination chez le hamster, avant et après infection par voie intranasale de hamsters vaccinés et non vaccinés, avant et après infection naturelle chez l'homme au cours d'une épidémie familiale. Elles apportent les conclusions suivantes : dans les sérums tardifs, dits de post-infection, des anticorps inhibant la réduction du TTC sont plus souvent décelés que des anticorps fixant le complément ou inhibant l'hémagglutination, alors que les anticorps inhibant

la réduction du TTC sont absents des sérums précoces de préinfection ou de la phase aiguë de l'infection naturelle avec signes pathologiques.

Par contre, les sujets possédant des anticorps inhibant la réduction du TTC avant infection semblent faire une infection inapparente, Mycoplasma Pneumoniae étant isolé de leur pharynx alors qu'ils n'ont aucun signe pulmonaire.

Cette méthode ést donc spécifique et sensible, mais donne plus tardivement une réponse pour le diagnostic d'une infection aiguë que la fixation du complément ou l'inhibition de l'hémagglutination. Son association avec l'une de ces techniques serait d'un grand intérêt pour le diagnostic sérologique.

Par contre, alors que les anticorps fixant le complément ou inhibant l'hémagglutination ne décèlent pas avec une fréquence suffisante l'état d'immunité, il semble que la présence d'anticorps inhibant la réduction du TTC soit associée à un état de résistance à la maladie. L'étude de ces anticorps trouve donc une application importante dans l'appréciation de la valeur d'un vaccin.

D) Inhibition de croissance révélée par inhibition de la fermentation du glucose

En 1966, Taylor-Robinson et collaborateurs (126) ont montré que l'addition de l'antisérum spécifique au milieu de croissance de Mycoplasma Pneumoniae inhibe la multiplication du germe, mais aussi l'acidification de ce milieu; un indicateur coloré comme le rouge de phénol permet facilement d'apprécier le pH à l'oeil nu. Un test colorimétrique est donc proposé pour le titrage des anticorps sériques; leur présence se traduit par l'absence de virage de l'indicateur.

La souche FH de Mycoplasma Pneumoniae est cultivée dans le milieu classique de Hayflick additionné de glucose et de rouge de phénol, incubé à 34°C jusqu'à variation du pH de 7,8 à 7,3. Ces stocks infectieux répartis en petits volumes sont congelés à -70°C; leur titrage est réalisé par dilution de 10 en 10 dans du milieu de culture neuf. Après incubation à 34°, le titre

est déterminé par la plus grande dilution ayant provoqué le virage de l'indicateur.

Afin de disposer de sérums de référence, des lapins sont inoculés avec une suspension homogénéisée de poumons d'embryon de poulet infectés par Mycoplasma Pneumoniae; d'autre part, des paires de sérum humain sont prélevées chez des volontaires avant et trois semaines après inoculation par voie pharyngée de la souche FH.

Tous les sérums étudiés sont au préalable décomplémentés par un chauffage de 1/2 heure à 56°C.

Le titrage des anticorps est réalisé par micro-méthode dans les godets en U d'une plaque de matière plastique; il n'est pas nécessaire de la stériliser ni d'observer des précautions particulières pour éviter les contaminations bactériennes.

Les sérums sont dilués de deux en deux dans du milieu de culture enrichi de glucose et de rouge de phénol à partir d'une dilution au 1/2,5 et sous volume de 0,025 ml. L'inoculum de Mycoplasma Pneumoniae est ajouté à chaque dilution sérique sous volume de 0,05 ml et le volume total dans chaque godet est porté à 0,2 ml par addition de 0,125 ml de milieu de culture.

Des godets témoins ne reçoivent que l'inoculum de Mycoplasma Pneumoniae = 0,05 ml et 0,15 ml de milieu de culture.

Les plaques sont scellées hermétiquement au ruban adhésif "scotch" et incubées en aérobiose à 34°C. Les variations de pH dans chaque godet sont appréciées en éclairant les plaques placées au-dessus d'un miroir par une lumière blanche fluorescente.

Le titre du sérum est donné par la plus grande dilution qui empêche une baisse de pH de plus de 50 %, appréciée par comparaison avec le pH des godets témoins contenant un même nombre de germes cultivés en l'absence d'antisérum. Au cours de leur étude, Taylor-Robinson et collaborateurs préconisent l'emploi d'un inoculum dilué à 10^3 ou 10^4 capable de provoquer le virage de l'indicateur, et recommandent une lecture précoce du test, correspondant à une variation de pH parmi les témoins de l'ordre d'une demi-unité.

Le fait de décomplémenter les sérums à titrer semble les débarrasser d'inhibiteurs non spécifiques de faible titre.

Les auteurs insistent sur la nécessité d'utiliser dans le milieu de culture du sérum de cheval non décomplémenté qui apporte un facteur accessoire thermolabile, indispensable à la mise en évidence de l'activité de l'anticorps spécifique et dont la nature n'est pas précisée. En effet, si le sérum de cheval incorporé au milieu de culture est préalablement chauffé une heure à 56°C, l'activité spécifique inhibitrice de croissance d'un antisérum de lapin est considérablement réduite. Ils ont pensé que le facteur thermolabile nécessaire était peut-être le complément ou une substance analogue et que dans ce cas, le sérum de cobaye frais augmenterait le titre d'un antisérum spécifique.

Des expériences réalisées en présence de sérum de cobaye chauffé et non chauffé à la concentration finale de 6 % donnent les résultats suivants :

- Le sérum de cobaye frais diminue la croissance de la souche FH de 10.000 fois ou plus.
- Le sérum de cobaye chauffé n'en diminue la croissance que de 100 fois.
- Cependant le titre d'un antisérum n'est pas affecté par l'addition de sérum de cobaye chauffé ou non.

L'activité inhibitrice d'un antisérum, supprimée par chauffage du sérum de poulain, est partiellement restaurée par l'addition de 6 % de sérum de cobaye non chauffé au test. Il existe donc dans les sérums de cheval et de cobaye frais un facteur accessoire thermolabile qui est important pour la démonstration de l'activité des anticorps spécifiques. Il n'est pas prouvé qu'il s'agisse d'un composant thermolabile du complément. Cette observation est en accord avec celle de Priestly (1952), mais opposée à celle de Edward et Fitzgerald (1954).

Enfin, les auteurs ont parfois observé un phénomène de zone dont le mécanisme n'est pas précisé.

Cette méthode semble être d'une extrême spécificité. Des sérums de lapin hyperimmunisés contre les différents autres mycoplasmes humains et ayant un titre élevé pour le mycoplasme homologue n'inhibent pas la fermentation du glucose due à Mycoplasma Pneumoniae.

Les sérums de volontaires prélevés avant et trois semaines après inoculation expérimentale de Mycoplasma Pneumoniae par voie nasopharyngée témoignent de l'apparition et d'une montée des anticorps inhibant la fermentation. Une parfaite concordance est observée dans les réponses sérologiques entre l'inhibition de la fermentation et l'inhibition de la réduction du tétrazolium. Ces deux tests seraient donc d'une égale sensibilité et détectent 22 % des sujets possédant des anticorps spécifiques anti-Mycoplasma Pneumoniae dans une population adulte de plus de 30 ans d'âge.

Des résultats identiques sont obtenus d'une séance de titrage à une autre, même semble-t-il pour des variations assez importantes du titre de l'inoculum, si la lecture des résultats est assez précoce, contemporaine du virage d'une demi-unité de pH des témoins.

La reproductibilité irait donc de pair avec la spécificité et la sensibilité; le gros avantage de cette méthode est la simplicité de son exécution si on la compare aux autres méthodes basées sur l'inhibition de croissance ou aux techniques basées sur l'immunofluorescence. Les applications en seraient nombreuses : appréciation de l'état immunitaire d'un individu après inoculation expérimentale, après infection naturelle, après vaccination; enfin étude épidémiologique.

Nous avons donc choisi cette méthode de titrage des anticorps sériques par inhibition de la fermentation du glucose. Nous avons étudié les principaux facteurs intervenant dans la réaction et décrit la technique adoptée.

*

* *

IV - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE TITRAGE DES ANTICORPS SPECIFIQUES ANTI-MYCOPLASMA PNEUMONIAE PAR INHIBITION DE LA FERMENTATION DU GLUCOSE

1 - LES SERUMS

Notre étude a porté sur 141 sérums isolés et 102 paires de sérums de malades ou de convalescents qui nous ont été adressés par :

- Messieurs les professeurs BASTIN, VIC-DUPONT, DOMART, MOLLARET et PAYET de l'Hôpital Claude-Bernard;
- Et par divers hôpitaux de Paris et de province :
  - . L'Hôpital Hérold (services des professeurs ALISON et HERRAULT)
  - . Le Centre Hospitalier régional de Caen (services des professeurs MOREL et LE MENAGER).
  - . L'Hôpital Bretonneau
  - . L'Hôpital de Gonesse (service du professeur MARTINETTI)
  - . L'Hôpital Beaujon
  - . L'Hôpital Bichat (service du professeur DEBRAY)
  - . L'Hôpital de l'Hôtel-Dieu
  - . L'Hôpital de Saint-Denis (service du Docteur SEE)
  - . L'Hôpital Saint-Joseph (service du Docteur RENDU)
  - . Le Centre Hospitalier intercommunal de Créteil
  - . L'Hôpital d'Aulnay-sous-Bois
  - . L'Hôpital Boucicaut (service du professeur MEYER)
  - . L'Hôpital Foch (service du professeur MORIN)
  - . L'Hôpital Tenon
  - . L'Hôpital de la Salpétrière (service du professeur BUGE)
  - . Le Centre Hospitalier régional de Toulouse (service du professeur ENJALBERT).

Après décantation, s'ils doivent être titrés rapidement, ces sérums sont conservés à +4°C, sinon ils sont stockés à -20°C. Avant titrage, ils sont décomplémentés par un chauffage d'une demi-heure à 56°C.

2 - LE MATERIEL

Les titrages sont réalisés dans des tubes à hémolyse en verre stériles. Des essais ont été tentés plusieurs fois avec des tubes à hémolyse en matière plastique de différentes marques, mais ils ont toujours échoué; le plastique utilisé semblait ne pas permettre la culture de Mycoplasma Pneumoniae à des titres assurant le virage de l'indicateur.

Les tubes sont fermés avec des bouchons en silicone (bouchons "Versilic" n° 1F de la Manufacture Générale de Caoutchouc) et il est absolument nécessaire que les tubes inoculés soient fermés hermétiquement; en l'absence d'une fermeture parfaite, le virage de l'indicateur de pH ne se produit pas.

Les conditions de stérilité ne sont pas très poussées; on travaille simplement à proximité d'un bec Bunsen. Les pipettes utilisées sont stériles. Les dilutions sont pratiquées grâce à l'emploi d'une autopipette manuelle BBL à laquelle est adapté un embout de plastique ou fibrotip dont la stérilité est assurée par exposition aux rayons ultraviolets avant usage.

3 - L'ANTIGENE

a) La souche de référence que nous utilisons est la souche FH isolée par Liu en 1957. Nous la devons à l'obligeance de Monsieur PERREAU, Docteur Vétérinaire, qui nous l'a remise en ampoule lyophilisée.

La première mise en culture a été faite le 28 avril 1966 et, depuis cette date, la souche est repiquée toutes les semaines.

Un premier titrage réalisé le 10 mai 1966 par numération des colonies sur boîte de pétri montre un titre $\# 1.10^4$. Un deuxième titrage fait le 5 juillet 1966 donne un titre $\# 1.10^6$. Le 8 novembre 1968 un nouveau titrage donne un titre $\# 1.10^8$; nous obtenons désormais régulièrement un titre $\# 1.10^{10}$.

Cette montée progressive du titre correspond probablement d'une part à une adaptation de la souche à la culture in vitro, et d'autre part à une amélioration des lots d'extrait de levure et de sérum utilisés.

Le repiquage hebdomadaire se fait en grands tubes de 17 cc, en milieu liquide de croissance sans glucose. On réalise une gamme de dilution de 10^{-2} à 10^{-10} en partant de la dilution 10^{-8} de la semaine précédente.

b) Les milieux de culture utilisés.

Le milieu de base est une macération de coeur de boeuf additionnée de 1 % de peptone et de 5 ‰ de NaCl selon la formule de Norton, Smith et Leberman (1951), commercialisée par Difco. Ce milieu peut être solidifié par l'incorporation de 1,4 % d'agar.

Le milieu solide est utilisé pour la numération des colonies.

Pour sa préparation, on ajoute 34 g de milieu de base déshydraté Bacto PPLO Agar (Difco - Référence 0412-01 et 0412-02) à un litre d'eau distillée fraîche. On met au bain-marie à 100° jusqu'à dissolution complète. Puis on ajoute 14,3 ml d'une solution mère d'acétate de Thallium à 5 % dans l'eau distillée et on vérifie que le pH est à 7,8. Le milieu est ensuite réparti en petits flacons à raison de 14 cc par flacon. On autoclave 15 minutes à 121°C et après refroidissement, les flacons sont bien fermés et conservés à +4°C.

On fait fondre au moment de l'emploi, et après avoir ramené à 50°C, on incorpore stérilement :

- 4 cc de sérum de cheval non décomplémenté
- 2 cc d'extrait de levure à 25 %
- 0,2 à 0,4 cc de solution mère de pénicilline.

On homogénéise bien et on coule en boîte de pétri de 5 cm de diamètre, à raison de 5 ml par boîte, si bien qu'un flacon permet de préparer 4 boîtes de pétri. On laisse sécher et on ensemence par inondation avec un volume déterminé de culture en milieu liquide. Les boîtes sont ensuite fermées hermétiquement avec du sparadrap afin d'éviter leur dessèchement puisqu'elles doivent rester longtemps à l'étuve.

Le milieu liquide est à base de "Bacto PPLO Broth dehydrated W/O CV" (Difco - référence : 0554-01 et 0554-02) que l'on met en solution à raison de 21 g dans 970 ml d'eau distillée fraîche. On ajoute 14,3 ml de la solution mère d'acétate de Thallium à 5 % et 20 ml d'une solution de rouge de phénol. Le pH est ajusté entre 7,8 et 8 et on répartit en flacons que l'on autoclave 15 mn à 121°C. Le tout est conservé à +4°C.

Au moment de l'emploi, on ajoute stérilement :

- 20 % de sérum de cheval non décomplémenté
- 10 % d'extrait de levure à 25 %
- 1 % de solution mère de pénicilline (contenant 1.000.000 U/cm3).

A ce "milieu de croissance" on ajoute extemporanément le glucose quand on désire un "milieu complet"; nous utilisons des ampoules à 30 % à la concentration finale de 1 %.

Préparation des produits ajoutés au milieu de base

- Acétate de Thallium : Il est utilisé à la concentration finale de 1/2000, c'est-à-dire 0,5 mg/cc de milieu final. La solution mère est 100 fois plus concentrée et préparée en mettant 5 g dans 100 cc d'eau distillée. Il est conservé à +4°C.

- Extrait de Levure : 250 g de "Bacto Yeast Extract" (Difco - référence : 0127-01 et 0127-02) sont dissous dans 1 000 ml d'eau distillée par chauffage jusqu'à ébullition; on obtient ainsi une solution brune dont le pH est ajusté à 8 avec de la soude. On la répartit en échantillons qui sont autoclavés 15 mn à 121°C puis conservés à -20°C.

- Pénicilline : La concentration finale est, suivant les auteurs, de 1000 U à 2000 U/cc de milieu. La solution mère est 1000 fois concentrée, contenant 1.000.000 U/cc, préparé stérilement. 0,1 cc de la solution mère (soit 100.000 U) est rajouté chaque fois que l'on prépare 10 cc de milieu pour réaliser une concentration de 1.000 U/cc. Elle est stockée à -20°C mais conservée à -4°C quand on doit l'utiliser rapidement.

- Sérum de cheval : On utilise en fait du sérum de poulain prélevé aseptiquement. Il nous est fourni par les laboratoires SORGA (*). Stérilisé par filtration sur membrane millipore GS 0,22 M, puis conservé à -20°C, il n'est pas décomplémenté.

c) Le contrôle de l'identité de cette souche en tant que mycoplasma Pneumoniae est pratiqué à intervalles réguliers. Outre la fermentation du glucose, il s'appuie sur les critères biochimiques et antigéniques suivants :

1 - La production d'une hémolyse de type β pour les globules rouges humains de groupe O et pour les globules rouges de cobaye. Nous l'avons mise en évidence par la technique suivante :

Les globules sont recueillis stérilement dans une solution d'Alsever ; après une centrifugation de 10 minutes à 2000 tours/mn, 0,6 ml du culot sont incorporés dans 20 ml de milieu de croissance gélosé fondu et ramené à 45°. 3 ml de cette gélose au sang sont coulés en une couche mince à la surface d'un milieu solide en boîte de pétri de 5 cm de diamètre où une dilution de notre souche de référence a été inoculée 10 jours auparavant. Les colonies, bien isolées et bien développées, s'entourent d'une zone d'hémolyse totale, très semblable à la β hémolyse du streptocoque, et la colonie reste visible par transparence au centre de la plage hémolysée.

2 - L'inhibition de la croissance de notre souche par un sérum de référence anti-Mycoplasma Pneumoniae. Le sérum nous a été délivré par "Microbiological Associates" (Bethesda - Maryland). Il s'agit d'un sérum de lapin hyperimmunisé utilisable dans les réactions d'identification par inhibition de croissance. Non inactivé, lyophilisé, il est à reconstituer avec 1 ml d'eau distillée. Le titre indiqué lors de la commercialisation est de 1/32. Par la technique que nous allons décrire, nous avons titré le pouvoir inhibant la croissance de ce sérum de référence vis-à-vis de la souche FH entretenue par nos soins. Nous avons obtenu l'inhibition du virage de 1/2 unité de pH avec une dilution de 1/32.

(*) Laboratoires SORGA - 28 Avenue Corentin-Cariou - PARIS XIXème.

4 - ETUDE CINETIQUE DU VIRAGE DE L'INDICATEUR DE pH EN FONCTION DE L'INOCULUM ET DU TEMPS D'INCUBATION

Nous avons établi ces données de base au cours de l'expérience suivante :

Une culture de Mycoplasma Pneumoniae obtenue dans un milieu sans glucose après 7 jours d'incubation à 35°C est diluée de 10 en 10 de 10^{-2} à 10^{-11} sous volume de 10 ml dans une galerie de tubes de 17 contenant du milieu complet avec glucose. Les tubes sont capuchonnés puis incubés à 35°C. Le pH de chaque tube est apprécié tous les jours par comparaison avec une gamme, et noté. Cette gamme a été réalisée par nos soins avec le milieu complet additionné de HCl N jusqu'à obtention des pH 7,9 - 7,7 - 7,5 ... le pH de chaque tube étant contrôlé au pH mètre Zéromatic Beckmann; les nuances obtenues sont ainsi réellement comparables malgré la tonalité propre des produits d'enrichissement.

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Jours d'incubation à 35°	Dilutions									
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
	pH obtenus									
0	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9
1	7,8	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9
2	6,5	7,1	7,5	7,7	7,8	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9
3	6,1	6,1	6,1	6,3	6,7	7,1	7,7	7,9	7,9	7,9
4	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,7	7,5	7,9
5	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	7,9
6	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	7,9
7	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	7,9

Cinétique du virage de l'indicateur de pH en fonction de l'inoculum et du temps d'incubation

Nous pouvons en conclure que :

1°) La baisse de pH est très rapide quand l'inoculum est massif. Elle survient en 48 heures avec des inoculums élevés, en 72 heures avec des inoculums dilués à 10^{-7}; le quatrième jour, elle est flagrante avec des inoculums de 10^{-8} et 10^{-9}; elle est décelable dès le quatrième jour avec un inoculum dilué à 10^{-10}. Au-delà du cinquième jour de culture, elle n'est plus appréciable qu'en tant que phénomène de tout ou rien.

2°) Le virage de l'indicateur est régulièrement obtenu à la dilution 10^{-10}; nous l'avons donc inoculée avec, au moins, une unité fermentative (UFG = unité fermentant le glucose), c'est-à-dire que notre culture de départ contient au moins 1.10^{10} UFG dans 1 ml. Dans ces conditions, cette expérience étant régulièrement reproductible, nous obtenons chaque semaine à jour fixe, par inoculation d'un milieu sans glucose, une suspension de Mycoplasma Pneumoniae de titre élevé et approximativement défini.

A partir de la dilution 10^{-9}, l'agent infectieux a été de nouveau isolé sur milieu solide de Hayflick et son identité contrôlée par les tests que nous avons décrits plus haut. Des géloses au sang et des géloses Sabouraud, inoculées avec le contenu de ce tube, n'ont donné aucune culture.

5 - MODALITES DU TITRAGE DE L'AGENT INFECTIEUX

Nous avons employé deux méthodes de titrage :

- le titrage en milieu liquide basé sur la fermentation du glucose
- le titrage en milieu solide basé sur la numération des colonies obtenues.

Le titrage en milieu liquide d'une culture de Mycoplasma Pneumoniae est réalisée en pratiquant des dilutions de 10 en 10 de 10^{-2} à 10^{-11} en milieu complet dans des tubes à hémolyse sous volume total de 1 ml. Ces dilutions, après fermeture correcte des tubes, sont incubées 7 jours à 35°C. Ce délai de 7 jours a été établi après avoir constaté qu'au-delà du 7ème jour, aucune des dilutions plus élevées ne parvient à faire virer l'indicateur de pH.

Ce titre approximatif est donné par la dernière dilution qui provoque l'acidification; ce tube a reçu de 1 à 9 UFG.

Les titrages en milieu solide sont réalisés en étalant 0,1 ml de chaque dilution de 10 en 10 de la culture à titrer sur une boîte de pétri de 5 cm de diamètre contenant une gélose de Hayflick. Celles-ci sont incubées à 35°C sous atmosphère à 4 % de CO_2 dans un four Lwoff pendant 10 à 12 jours. A cette date, il est possible de compter les colonies sur chaque boîte en s'aidant d'une loupe; il est inutile de recourir à l'hémolyse pour les révéler. Le titre est exprimé en nombre d'unités formant colonies (UFC) par ml.

Comparaison des titres obtenus par fermentation et par numération des colonies

A l'aide de ces deux techniques de titrage, nous avons étudié la correspondance entre le titre très approximatif donné par la fermentation du glucose et le nombre de colonies obtenues sur milieu solide par l'expérience suivante :

Une culture de Mycoplasma Pneumoniae obtenue dans un milieu sans glucose après 7 jours d'incubation à 35°C est diluée de 10 en 10 de 10^{-2} à 10^{-11} sous volume de 10 ml dans une galerie de tubes de 17 contenant du milieu complet avec glucose.

En partant des tubes contenant les dilutions 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8} et 10^{-10}, aux 3ème, 5ème et 7ème jours, nous avons titré les mycoplasmes présents dans 0,1 ml de chaque tube selon les deux techniques décrites plus haut.

1°) En milieu liquide complet par fermentation du glucose ; ce titre étant exprimé en UFG par ml et ne donnant qu'une approximation de 1 à 10.

2°) En milieu solide par numération des colonies, le titre étant alors exprimé de façon beaucoup plus précise, en nombre d'UFC par ml.

Les résultats en sont exprimés dans le tableau ci-après.

Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

- Un titre élevé # 1.10^{10} est obtenu dès le 3ème jour dans ce milieu complet enrichi de glucose, même avec un inoculum très faible.
- L'acidification précoce due à la fermentation du glucose entraîne une baisse de titre rapide et même une destruction totale de l'agent infectieux en 48 heures environ.

- Les titres obtenus par fermentation du glucose sont, dans presque tous les cas, légèrement supérieurs à ceux obtenus en milieu solide. Il se peut que les mycoplasmes altérés par une acidification brutale soient plus volontiers capables de se multiplier en milieu liquide, qu'initier une colonie en milieu solide.

COMPARAISON DES TITRES OBTENUS PAR FERMENTATION
ET PAR NUMERATION DES COLONIES

Dilution de l'inoculum	Inoculum Approximatif en UFG/ml	Jour du Titrage	pH du Milieu	Titre fermentant le Glucose Exprimé en UFG/ml	Titre Exprimé UFC/ml
10^{-2}	1.10^{8}	3ème	6,1	1.10^{4}	0
		5ème	6,1	1.10^{1}	0
		7ème	6,1	1.10^{1}	0
10^{-4}	1.10^{6}	3ème	6,1	1.10^{10}	$2,5.\ 10^{9}$
		5ème	6,1	1.10^{1}	0
		7ème	6,1	1.10^{1}	0
10^{-6}	1.10^{4}	3ème	6,7	1.10^{10}	$4,5\ .10^{9}$
		5ème	6,1	1.10^{1}	0
		7ème	6,1	0	0
10^{-8}	1.12^{2}	3ème	7,7	1.10^{9}	$2.\ 10^{9}$
		5ème	6,1	1.10^{2}	0
		7ème	6,1	1.10^{1}	0
10^{-10}	1 à10	3ème	7,9	1.10^{10}	$9,5.\ 10^{6}$
		5ème	6,1	1.10^{10}	$1.\ 10^{8}$
		7ème	6,1	0	0

6 - COMPARAISON DES TITRES OBTENUS DANS DES MILIEUX AVEC ET SANS GLUCOSE

Nous avons réalisé, en grands tubes de 17, deux séries de dilution de 10 en 10 de 10^{-2} à 10^{-8}, l'une dans du milieu de croissance (sans glucose), l'autre dans du milieu complet (avec glucose). Les 6ème, 8ème et 10ème jours, 0,1 ml de chaque dilution des deux galeries sont titrés par fermentation.

Pour toutes les dilutions faites en milieu glucosé, les repiquages en vue du titrage ne poussent pas. Par contre, dans chaque dilution en milieu de croissance sans glucose, on peut démontrer la présence de l'agent infectieux à un titre de 1.10^{1} UFG/ml.

On peut en conclure qu'en présence de glucose, les germes sont rapidement tués par l'acidification du milieu. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'expérience précédente sur l'étude de la correspondance entre le virage de pH et le nombre de germes produits.

7 - CONDUITE DU TITRAGE DES SERUMS PAR INHIBITION DE LA FERMENTATION DU GLUCOSE

Un nombre déterminé de Mycoplasma Pneumoniae est déposé dans chaque tube de dilution sérique à considérer en présence d'une quantité constante de milieu complet avec glucose et indicateur de pH.

La sérologie est pratiquée à jour fixe, chaque semaine et, par la même occasion, le germe est repiqué pour la semaine suivante dans un milieu de croissance sans glucose.

Il faut donc prévoir deux lots de milieux :

- quatre tubes de 9,9 ml de milieu sans glucose pour le repiguage du germe;
- du milieu complet avec glucose et rouge de phénol réparti dans deux flacons habituellement à raison de 50 et 100 ml, pour la sérologie, et dans deux tubes à raison de 9 et 9,9 ml pour le contrôle du titre de l'inoculum.

Pour chaque sérum à titrer, on dispose d'une galerie de 10 tubes à hémolyse stériles. On prévoit de plus :

- une galerie de 5 tubes qui seront des témoins du milieu non inoculé,
- une galerie de 5 tubes qui seront des témoins de l'inoculum
- deux galeries de 5 tubes qui servent à contrôler le titre de l'inoculum.

Le milieu complet avec glucose et rouge de phénol du flacon de 50 ml est distribué au rhéomètre (autopipette manuelle BBL) à raison de :

- 0,8 ml dans les tubes témoins milieux
- 0,2 ml dans les 15 tubes témoins de l'inoculum
- 0,6 ml dans le premier tube de chaque série de 10 tubes, il servira de témoin sérum
- 0,2 ml dans les 9 autres tubes de chaque série.

On procède ensuite aux dilutions sériques : dans les deux premiers tubes de chaque série, on dépose 0,2 ml de sérum à étudier. Le premier tube étant le témoin sérum, à partir du deuxième on pratique, sous volume de 0,2 ml, des dilutions de 2 en 2 qui vont du 1/2 au 1/512.

L'inoculum est alors préparé en partant de la culture de Mycoplasma Pneumoniae établie la semaine précédente dans un milieu de croissance sans glucose à la dilution 10^{-8}. On prélèvera 0,1 ml de ce tube, où le titre est de l'ordre de 1.10^{10} UFG/ml, et on le dépose dans un des quatre tubes contenant 9,9 ml de milieu de croissance sans glucose; on obtient ainsi une dilution 10^{-2}. Après avoir agité, on en prélève 0,1 ml que l'on dépose dans le deuxième tube pour obtenir une dilution 10^{-4}. En procédant de la même manière, on obtient les dilutions 10^{-6} dans le 3ème tube et 10^{-8} dans le quatrième. 1 ml de l'avant-dernier tube est inoculé dans le flacon de 100 ml de façon à obtenir une dilution 10^{-8} qui représente l'inoculum. Cet inoculum contient donc de 100 à 1000 UFG/ml.

Il est distribué à raison de :

- 1 ml dans le tube de 9 ml de milieu complet avec glucose pour obtenir la dilution 10^{-9} et 0,1 ml dans le tube de 9,9 ml de ce même milieu, ce qui donne la dilution 10^{-10}.
- 0,6 ml dans chacun des cinq tubes témoins de l'inoculum à 10^{-8}
- 0,6 ml par tube de chaque série de dilution sérique (à l'exception du premier qui est le témoin sérum).

Les dilutions finales de chaque sérum s'étalent donc de 1/8 à 1/2048. Chaque tube contient un volume total de 0,8 ml et a reçu de 60 à 600 UFG.

Parallèlement est réalisé un contrôle du titre de l'inoculum : 0,6 ml des dilutions de l'inoculum 10^{-9} et 10^{-10} sont respectivement déposés dans les cinq tubes de chaque galerie de contrôle de l'inoculum à 10^{-9} et 10^{-10}.

Un sérum témoin positif est incorporé à chaque séance de sérologie. Nous avons d'abord utilisé le sérum de référence dont nous avons précisé les caractéristiques précédemment; mais ce sérum est très coûteux et, par la suite, nous avons utilisé comme témoins des sérums positifs à haut titre sélectionnés par nos soins.

Les tubes sont fermés hermétiquement par des bouchons siliconés 1F et, après agitation du portoir à la main, sont placés à l'étude à 35°.

La lecture se fait au quatrième jour. Les changements de couleur sont observés dans des conditions normales d'éclairage naturel. Les 5 témoins non inoculés n'ont pas changé de couleur.

Les 5 témoins de l'inoculum ont viré au jaune.

Le titrage de l'inoculum montre que :

- les cinq tubes inoculés avec 0,6 ml de la dilution 10^{-9} ont régulièrement viré
- les cinq tubes inoculés avec 0,6 ml de la dilution 10^{-10} virent très irrégulièrement.

Les témoins sérum de chaque série sont rouges.

Il est exceptionnel qu'un virage au jaune indique que le sérum est souillé par une bactérie capable de pousser en présence d'acétate de Thallium et de pénicilline. La plus grande dilution sérique inhibant le virage de l'indicateur de pH d'une demi-unité est considérée comme le titre du sérum en anticorps inhibant la croissance du germe révélée par fermentation.

8 - MISE EN EVIDENCE DE L'INHIBITION DE CROISSANCE QUE TRADUIT LA NON-FERMENTATION PAR UN SERUM POSITIF

Pour démontrer que la non-fermentation provoquée par les anticorps était bien due à l'inhibition de la croissance du germe, nous avons titré les UFG présentes dans chaque dilution du titrage d'un sérum positif au 1/128 après la lecture du quatrième jour.

Les résultats sont exprimés dans le tableau ci-dessous :

Dilution	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$
Titre en UFG/ml	0	0	0	0	1.10^{3}	1.10^{10}	1.10^{10}	1.10^{10}	1.10^{10}

Nombre d'UFG présentés dans chaque dilution d'un sérum positif au 1/128 le quatrième jour

La non-fermentation correspond donc à une inhibition de croissance.

Dans la dilution sérique répondant au titre du sérum, c'est-à-dire à un défaut de virage de l'indicateur d'une demi-unité de pH, l'inhibition est de 70 %.

9 - ETUDE DES PRINCIPAUX FACTEURS DE LA REACTION

a) Rôle du titre de l'inoculum dans la sensibilité de la réaction

Toute réaction de neutralisation est conditionnée par la quantité d'agents infectants mise en présence des anticorps. Pour apprécier l'importance de ce facteur sur la sensibilité de la réaction, nous avons réalisé l'expérience suivante :

Un sérum positif a été titré par la technique décrite en faisant varier les dilutions de l'inoculum. Nous avons réalisé 7 séries parallèles de dilutions sériques allant du 1/8 au 1/512, et chaque série a été inoculée avec des dilutions différentes d'un même inoculum. Ces dilutions étaient réalisées de 10 en 10 de 10^{-2} à 10^{-8}. Nous avons procédé à trois lectures les 4ème, 5ème et 6ème jours. Les résultats sont exprimés dans le tableau ci-dessous.

RESULTATS EN FONCTION DU TITRE DE L'INOCULUM ET DU JOUR DE LECTURE

Dilution de l'inoculum	Nombre de UFG/ml de l'inoculum	Jour de lect.	Dilutions sériques						
			$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$
10^{-2}	6.10^{7} à 6.10^{8}	4	-	-	-	+++	+++	+++	+++
		5	-	-	++	+++	+++	+++	+++
		6	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
10^{-3}	6.10^{6} à 6.10^{7}	4	-	-	-	+++	+++	+++	+++
		5	-	-	++	+++	+++	+++	+++
		6	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
10^{-4}	6.10^{5} à 6.10^{6}	4	-	-	-	++	+++	+++	+++
		5	-	-	+	+++	+++	+++	+++
		6	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
10^{-5}	6.10^{4} à 6.10^{5}	4	-	-	-	+	+++	+++	+++
		5	-	-	-	+++	+++	+++	+++
		6	-	-	++	+++	+++	+++	+++
10^{-6}	6.10^{3} à 6.10^{4}	4	-	-	-	-	+++	+++	+++
		5	-	-	-	+++	+++	+++	+++
		6	-	-	++	+++	+++	+++	+++
10^{-7}	6.10^{2} à 6.10^{3}	4	-	-	-	-	+++	+++	+++
		5	-	-	-	++	+++	+++	+++
		6	-	-	-	+++	+++	+++	+++
10^{-8}	60 à 600	4	-	-	-	-	-	-	+++
		5	-	-	-	-	-	-	+++
		6	-	-	-	-	-	-	+++

Les résultats sont exprimés en nombre de croix selon l'intensité du virage de l'indicateur de pH.

Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

1°) La sensibilité de la technique augmente avec la dilution de l'inoculum. Au 4ème jour qui est le jour de lecture habituel avec un inoculum supérieur à 6.10^5 UFG/ml, ce sérum titre 1/32, avec un inoculum de 6.10^3 à 6.10^5 UFG/ml, il titre 1/64, et avec un inoculum de 60 à 600 UFG/ml, il titre 1/256.

2°) De plus, avec ce dernier inoculum, la limite du titre est beaucoup plus nette, le virage de pH est plus important dans le premier tube où la dilution sérique n'a plus apporté assez d'anticorps inhibant la croissance.

3°) Le titre varie suivant le jour de lecture avec les inoculums trop importants. Seul un inoculum de 60 à 600 UFG/ml par dilution nous donne un titre élevé, lisible dès le quatrième jour et qui ne se modifie pas lors d'une lecture ultérieure au cinquième et au sixième jour.

b) Rôle des facteurs sériques indispensables

Nous n'avons pas essayé de préciser la nature du facteur sérique thermolabile apporté par les 20 % de sérum de poulain non décomplémenté du milieu de culture. Les auteurs anglais (126) ont démontré qu'il était indispensable à la mise en évidence de l'anticorps spécifique.

c) Inhibiteurs non spécifiques des sérums

Effet du chauffage des sérums

Les Anglais (126) ont observé que le sérum de lapin de préinoculation inhibait au 1/10 le changement de couleur produit par Mycoplasma Pneumoniae; le chauffage du sérum à 56° pendant 30 mn supprime ce léger effet inhibiteur et n'altère pas de façon significative le titre élevé du sérum tardif. Nous avons donc inactivé les sérums à titrer par la chaleur en les maintenant pendant une demi-heure à 56°.

Les sérums hémolysés

Les sérums hémolysés que nous avons titrés montraient tous une

inhibition du changement de couleur à des titres variables, du 1/16 au 1/512. Après remise des tubes à l'étuve pendant 2 à 4 jours, un jaunissement progressif des dilutions sériques les plus fortes est observé. Nous avons donc supposé que l'hémolyse des globules rouges pouvait libérer un facteur non spécifique inhibiteur de la croissance de Mycoplasma Pneumoniae.

Dans le but de prouver l'existence de cet inhibiteur et espérant déterminer sa nature, nous avons réalisé les expériences suivantes :

Dans une série de titrages selon la technique sérologique dont nous avons décrit les modalités, nous avons remplacé le sérum à titrer par :
- une solution d'hémoglobine
- ou une solution d'extrait globulaire (fournie par l'Institut Pasteur)
- ou une solution de facteur X (fournie par la Faculté de Médecine de Paris)
- ou une solution de facteur V (fournie par la Faculté de Médecine de Paris)

La solution d'hémoglobine fut obtenue de la façon suivante : on a fait coaguler 10 cm3 de sang humain normal; après avoir éliminé tout le sérum, le caillot fut repris et broyé dans un mortier stérile avec du sable stérile. Après addition de 10 ml d'eau distillée stérile, le broyat fut filtré sur gaze et centrifugé, puis on a jouté au surnageant 25 % d'eau hypersalée à 34 ‰. Nous avons ainsi obtenu la solution d'hémoglobine utilisée.

A partir de chacun de ces quatre éléments, nous avons fait des dilutions de 2 en 2 de 1/2 à 1/2048 dans du milieu complet sous le volume de 0,2 ml. Puis comme pour le titrage des sérums, chaque tube reçoit 0,6 ml d'inoculum à la dilution 10^{-8}. Un témoin de chaque facteur et les témoins habituels de l'inoculum et du milieu non inoculé servent de contrôle.

Après quatre jours d'étuve à 35°C, on constate que le facteur V et l'extrait globulaire ne provoquent aucune inhibition. Il en est de même avec le facteur X bien que la couleur foncée qui lui est propre rende la lecture un peu plus difficile. Par contre, la solution d'hémoglobine semble provoquer une inhibition comparable à celle des sérums hémolysés : on n'observe d'acidification nette qu'à partir de 1/128. Après remise à l'étuve, la dilution 1/64 puis la dilution 1/32 jaunissent à leur tour au bout de quelques jours.

Le jour de la première lecture (c'est-à-dire après quatre jours d'étuve), la mesure du pH des tubes contenant les dilutions au 1/4, au 1/32 et au 1/2048 montre :

- dilution au 1/4 = pH 7,6
- dilution au 1/32 = pH 7,2
- dilution au 1/2048 = pH 6,4

Il existe donc une inhibition de l'acidification en présence d'une certaine quantité d'hémoglobine, mais elle n'est ni totale, ni durable. A partir des tubes contenant la solution d'hémoglobine diluée au 1/4 et au 1/6, et au quatrième jour d'incubation à 35°C, un repiquage en tubes et sur boîtes nous a donné une culture de Mycoplasma Pneumoniae dont nous n'avons pas encore chiffré l'abondance.

De cette expérience, nous pouvons tirer la conclusion que les sérums hémolysés contiennent une substance non spécifique inhibitrice de la fermentation du glucose ou de la croissance de Mycoplasma Pneumoniae ; cette substance est l'hémoglobine. Nous n'avons pas étudié le mécanisme de cette inhibition.

*
* *

V - ETUDE COMPARATIVE DES RESULTATS OBTENUS PAR INHIBITION DE LA FERMENTATION DU GLUCOSE ET PAR DEVIATION DU COMPLEMENT

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de comparer quelques-uns des résultats sérologiques obtenus par inhibition de la fermentation du glucose à ceux que pouvait nous fournir la réaction de fixation du complément jusqu'à présent plus couramment employée en France.

Matériel et méthodes employées

Nous avons utilisé successivement deux lots d'antigènes :

1°) Un antigène brut traité au phénol qui nous avait été fourni gracieusement en 1966 par le Docteur HOLPER, Directeur du Laboratoire de Recherches des Maladies Infectieuses des Laboratoires ABBOTT (North Chicago, Illinois, 60 064 USA). Cet antigène titrait 1/16 , devait être conservé à +4°C et utilisé après dilution au 1/4.

2°) L'antigène commercialisé par les laboratoires EUROBIO (Boulevard St Germain, Paris), provenant des "MICROBIOLOGICAL ASSOCIATES", Bethesda, Maryland, USA.

Nous disposions également d'un sérum de référence préparé sur lapin titrant 1/4 000 et conservé congelé à -30°. Il fut rapidement épuisé et remplacé par un des sérums de nos malades sélectionné pour son titre élevé décelé par les deux types de réaction.

Le titre des antigènes a été déterminé en engageant des dilutions croissantes d'antigène avec des séries parallèles du sérum de référence dilué de 2 en 2. L'unité antigénique était représentée par la plus grande dilution d'antigène provoquant la fixation du complément en présence de la plus grande dilution du sérum de référence.

Les tests sont réalisés dans des plaques en matière plastique de 100 x 150 mm, creusées de 96 cavités semisphériques ayant un volume de 0,35 ml (réf. PTR 96 - Labo Express Service, 8, rue Jasmin, Paris 16ème).

Les sérums sont dilués dans du tampon véronal de Mayer de 2 en 2 à partir du 1/8 et engagés dans la réaction sous le volume de 0,05 ml.

Deux unités antigéniques sont apportées sous le volume de 0,05 ml, et le complément à raison de 2 unités sous volume de 0,1 ml. La fixation est poursuivie une nuit à +4°C.

Le système hémolytique est le système fourni par l'Institut Pasteur = globules rouges de mouton à 2 % et sérum hémolytique dilué à 3 unités hémolytiques dans 0,1 ml, mélangés à parties égales; il est distribué sous le volume de 0,1 ml.

Chaque godet reçoit un volume total de 0,3 ml.

Les sérums étudiés en déviation du complément ont été choisis parmi ceux que nous avons reçus dans le but de diagnostiquer une infection à M. Pneumoniae pour le bon état de leur conservation et parce qu'ils présentaient un volume convenable.

Ils répondent à trois catégories :

1°) des paires de sérums dans lesquels nous avons démontré la présence d'anticorps inhibant la fermentation due à M. Pneumoniae;

2°) quelques sérums ou paires de sérums qui sont inférieurs à 1/8 en inhibition de croissance;

3°) quelques sérums hémolysés dont nous pensions qu'ils pouvaient contenir des inhibiteurs non spécifiques de la croissance du germe ou de la fermentation du glucose.

<u>Nous rapportons les résultats obtenus dans les tableaux suivants</u>

(Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution sérique correspondante)

<u>AC</u> : anticorps <u>IF</u> : inhibition de fermentation

<u>DC'</u> : déviation du complément <u>Antic</u> : anticomplémentaire

ETUDE EN DEVIATION DU COMPLEMENT DE SERUMS OU SONT DECELES DES ANTICORPS INHIBANT LA FERMENTATION DU GLUCOSE PAR MYCOPLASMA PNEUMONIAE

N° des sérums	Dates	Titre en AC inhibant la fermentation du glucose	Titre en AC déviant le complément	
			Antigène Abbott	Antigène Eurobio
69 0553	25/3	< 8	< 8	< 8
	1/4	16	< 8	< 8
	3/4	256	< 8	< 8
69 0789	12/4	<8	256	-
	24/4	128	1024	-
69 1140	23/5	<8	< 8	< 8
	11/6	256	< 8	<8
69 1353	16/5	64	≥ 1024	-
	30/5	256	≥ 1024	-
	4/6	128	≥ 1024	-
69 0550	25/3	< 8	< 8	-
	24/4	128	Anticomplémentaire à la dilution 1/512	-
67 0044	20/1	< 8	2 048	2 048
	18/4	256	2 048	2 048
67 1417	25/6	< 8	-	< 8
	18/7	512	-	<8
69 1465	30/6	512	-	<8
	5/7	1024	-	<8
69 1687	31/7	64 (hémolysé)	≥ 512	-
	4/8	256	≥ 512	-

N° des sérums	Dates	Titre en AC. IF.	Titre en AC. DC'	
			Antigène Abbott	Antigène Eurobio
69 1595	21/7	< 8	32	-
	29/7	32	32	-
69 2513	22/12	< 8	-	< 8
	17/1/70	32	-	8
69 2220	15/11	< 8	-	épuisé
	19/11	256	-	128
	29/11	256	-	256
69 2209	14/11	16	-	256
	29/11	2048	-	épuisé
69 2180	8/11	64	-	128
	22/11	64	-	64
69 2407	9/12	< 8	-	< 8
	20/12	256	-	< 8
69 2251	18/11	16	8	-
	26/11	hémolysé	1024	-
69 0182	30/1	256	64	-
	13/2	32	16	-
69 0067	13/1	32	16	-
	18/1	32	16	-
69 2551	26/12	256	-	16
	9/1/70	< 8	-	16
69 2397	8/12	16	-	antic. au 1/16
	17/12	< 8		< 8
69 2223	15/11	256	-	Antic. au 1/32
	4/12	< 8	-	faiblement antic.
	17/12	< 8	-	faiblement antic.

N° des sérums	Dates	Titre en AC IF	Titre en AC - DC'	
			Antigène Abbott	Antigène Eurobio
69 2426	12/12	< 8	-	< 8
	24/12	128	-	< 8
69 0314	19/2	< 8	-	< 8
	26/2	128	-	épuisé
69 0402	3/3	< 8	-	< 8
	25/3	= 8	-	< 8
69 0067	13/1	32	-	16
	18/1	32	-	16
69 2509	24/12	16	-	< 8
	31/12	8	-	= 8
69 1515	4/7	32	-	< 8
	15/7	< 8	-	< 8
69 1377	18/6	32	-	< 8
	11/7	< 8	-	< 8
68 1926	26/12	16	-	< 8
	7/1	8	-	épuisé
68 1605	25/10	256	-	< 8
	4/11	128	-	< 8
68 0380	16/2	256	-	épuisé
	1/3	16	-	= 8
67 0146	6/3	128 (hémolysé)	-	Antic. au 1/16
	21/3	< 8	-	< 8

N° des sérums	Dates	Titre en AC - IF	Titre en AC - DC'	
			Antigène Abbott	Antigène Eurobio
69 0131	23/1	64	64	-
69 1771	27/8	64	64	-
69 2511	22/12	32	-	< 8
69 2504	20/12	128	-	< 8
69 2440	8/12	256	-	< 8
69 2439	8/12	128	-	< 8
69 2428	10/12	512	-	< 8
69 2117	28/12	16	-	< 8
69 2449	13/12	128	-	< 8
69 0516	21/3	8	-	< 8

ETUDE EN DEVIATION DU COMPLEMENT DE PAIRES DE SERUMS
OU DE SERUMS ISOLES NE POSSEDANT PAS D'ANTICORPS DECELABLES
EN INHIBITION DE FERMENTATION DE GLUCOSE

N° des sérums	Dates	Titre en AC - IF	Titre des AC' - DC'	
			Antigène Abbott	Antigène Eurobio
69 1200	27/5	< 8	< 8	-
	17/6	< 8	< 8	-
69 1333	16/6	< 8	< 8	< 8
	23/6	< 8	< 8	< 8
69 2128	21/5	< 8	< 8	-
	31/5	< 8	< 8	-
	7/7	< 8	< 8	-
69 0855	28/4	< 8	-	< 8
	14/5	< 8	-	< 8
69 2529	24/12	< 8	-	< 8
	2/1/70	< 8	-	< 8
69 2531	24/12	< 8	-	< 8
	31/12	< 8	-	< 8
69 2280	22/11	< 8	-	< 8
	2/12	< 8	-	< 8
69 2520	22/12	< 8	-	< 8
69 1708	9/8	< 8	-	< 8

ETUDE EN DEVIATION DU COMPLEMENT DE SERUMS POSSEDANT LA PROPRIETE D'INHIBER LA FERMENTATION DU GLUCOSE PAR M. PNEUMONIAE MAIS DONT LE CARACTERE HEMOLYSE NOUS FAIT REDOUTER L'EXISTENCE D'UNE INHIBITION NON SPECIFIQUE

N° des sérums	Dates	Titre en AC - IF	Titre en AC' - DC'	
			Antigène Abbott	Antigène Eurobio
66 0554	14/11	64	-	< 8
69 0525	20/3	32	≤ 8	-
68 0536	13/3	128	8	-
68 1110	21/6	128	< 8	-
69 1844	10/9	16	< 8	-
69 2252	14/11	64	-	< 8
69 0269	14/02	64	-	< 8
68 1605	25/10 4/11	256 128	< 8 < 8	- -
69 1687	31/7	64	≥ 512	-
70 0031	17/1	32	-	8
69 2251	18/11	16	8	-
67 1125	22/11	16	8	-
69 2289	23/11	16	-	8
66 0554	14/11	64	-	< 8
67 0146	6/3	128	-	Antic. au 1/16

Nous pouvons retenir les indications suivantes :

1°) Les titres absolus obtenus en déviation du complément sont plus élevés qu'en inhibition de fermentation; ces titres sont identiques avec l'un et l'autre des antigènes déviant le complément utilisés dans les neuf cas où les sérums ont été testés deux fois.

2°) 17 sérums ne contenant pas d'anticorps inhibant la fermentation du glucose au 1/8 sont également négatifs en déviation du complément.

4 sérums négatifs en I.F.G. ou faiblement positifs, ont des anticorps déviant le complément. Ce sont en fait des sérums précoces de malades qui vont ultérieurement élaborer des anticorps inhibant la fermentation.

3°) Les résums hémolysés, inhibant la fermentation parfois jusqu'à un titre de 1/128, et suspects d'inhiber la croissance de M. Pneumoniae grâce à des facteurs non spécifiques, sont négatifs en déviation du complément à six exceptions près; mais dans cinq de ces cas, le titre en déviation du complément est faible, égal à 1/8 et nous ne lui attribuons aucune signification valable. Le sérum 69 1687 dont le titre en déviation du complément est inférieur ou égal à 1/512 possède effectivement des anticorps spécifiques inhibant la croissance à 1/64, leur ascension ultérieure à 1/256 dont le sérum tardif en faisant foi.

4°) Les paires de sérums démontrant des anticorps inhibant la fermentation sont irrégulièrement positives en déviation du complément. Ces résultats, qui semblent quelque peu déroutants au premier abord, ne sont pas pour nous surprendre.

<u>Toute interprétation d'une méthode de diagnostic sérologique doit tenir compte des éléments suivants</u> :

1 - La spécificité de la technique utilisée et sa sensibilité
2 - La date des prélèvements sériques par rapport au début de l'infection
3 - Par là-même, la nature des immunoglobulines anticorps que contient le sérum
4 - La nature de l'antigène impliqué dans la réaction, et par conséquent, son mode de préparation.

1 - La spécificité de la technique utilisée a été affirmée par tous les auteurs qui l'ont pratiquée (126). Elle est basée sur l'expérimentation chez l'animal, hamster ou lapin. Chez ces animaux, les sérums de prévaccination ou de préinoculation expérimentale ne contiennent pas d'anticorps inhibant la croissance du germe à condition qu'ils aient été décomplémentés. Les sérums frais, non chauffés, contiennent par contre des inhibiteurs et parfois à titre élevé. Il en est de même pour certains sérums humains (52, 107).

Nous avons déjà vu et démontré que les sérums hémolysés, du fait de la présence d'hémoglobine, entraînent une inhibition de croissance non spécifique de M. Pneumoniae. Il est possible que d'autres inhibiteurs non spécifiques soient en cause dans quelques uns des cas où nous avons obtenu un faible titre inhibant dans le sérum précoce et l'absence d'anticorps à la dilution 1/8 dans le sérum tardif. Dans 2 cas, le sérum précoce inhibait à titre faible et était d'autre part anticomplémentaire. Nous pensons que le fait de décomplémenter les sérums des malades par chauffage d'1/2 heure à 56°C avant le titrage ne suffit pas à donner une sécurité absolue quant à la spécificité de certains titres faibles.

Il est non moins certain que le manque de corrélation entre les résultats des différentes méthodes sérologiques a été maintes fois souligné (51, 127), et il a été dit en particulier que les sérums de post-infection expérimentale ont presque tous des anticorps inhibant la croissance alors que peu sont positifs en déviation du complément (107).

2 - L'évolution des anticorps au cours de l'infection : les anticorps déviant le complément sont d'apparition plus précoce que les anticorps inhibant la fermentation; ils sont décelables dès le 7ème jour de la maladie et atteignent parfois déjà leur titre maximum; ils ne vont persister que quelques semaines ou mois (11). Leur caractère transitoire explique que la déviation du complément ne puisse être utilisée pour déceler les infections anciennes (127).

L'ascension des anticorps inhibant la croissance est limitée et progressive; ils atteignent leur maximum 1 à 6 mois après le début de l'infection, mais ils sont plus durables et vont persister après la disparition des anticorps déviant le complément.

3 - La nature des immunoglobulines décelées : SCHMIDT et coll. (106) et FERNALD et coll. (51) ont démontré que l'activité fixant le complément était associée aux fractions IgM (19 S) et IgG (7 S) des globulines sériques; mais le titre des IgM globulines est nettement plus élevé dans les sérums précoces, il va décliner au cours des semaines qui suivent pendant que le titre des IgG (7 S) augmente (51).

Les anticorps inhibant la croissance sont présents dans les IgM, puis ensuite plus largement dans les IgG, et il est démontré que les fractions IgA participent de façon significative à leur expression pendant la convalescence alors que ces fractions ne contiennent pas ou peu d'anticorps déviant le complément. Donc, seuls les anticorps inhibant la croissance ont été démontrés de façon significative dans les trois classes d'immunoglobulines sériques IgM, IgA et IgG, dont l'élaboration se succède dans les semaines qui suivent l'infection.

Chaque technique sérologique donne une réponse dont le schéma est fonction de son habilité à déceler les différentes immunoglobulines et de l'apparition de celles-ci dans le temps.

Cette réponse immunologique est encore conditionnée :

- par l'âge du sujet : SALIBA et coll. ont montré que plus l'enfant est jeune, plus la réponse en anticorps est transitoire;
- par l'importance de l'imprégnation antigénique qui varie selon qu'il existe une pneumonie ou une infection respiratoire bénigne;
- par l'existence d'une infection antérieure et d'une cicatrice immunologique ancienne.

4 - La nature de l'antigène impliqué dans la réaction sérologique : divers auteurs ont comparé les résultats obtenue en déviation du complément selon qu'ils utilisaient un antigène brut phénolé ou un antigène lipidique extrait par action d'un solvant organique (97), ou encore un antigène complet obtenu à partir de culture sur verre selon la technique de SOMERSON (121).

Dans ce dernier cas, le nombre de sérums positifs décelé est plus grand qu'avec l'antigène lipidique; les titres obtenus sont plus élevés d'une

dilution, et dans un cas, l'antigène complet détecte une augmentation significative du titre des anticorps alors que l'antigène lipidique ne décèle d'anticorps spécifiques dans aucun des deux sérums (11).

Il est donc intéressant de noter que par inhibition de la fermentation du glucose, où l'antigène est représenté par un germe intact vivant, nous avons pu déceler dans 7 cas une montée d'anticorps anti-mycoplasma Pneumoniae que ne décelait pas la déviation du complément.

Bien que cette technique d'inhibition de la fermentation ait témoigné, dans nos conditions de travail, d'une sensibilité certaine, les titres des anticorps obtenus par déviation du complément étaient souvent plus élevés.

*
* *

VI - BILAN DE NOS RESULTATS

1 - Etude des cas où nous avons observé une montée franche des anticorps inhibant la fermentation du glucose due à M. Pneumoniae

Nous avons observé dans 20 cas l'apparition ou une ascension significative des anticorps inhibant la fermentation.

Les résultats en sont consignés dans les tableaux suivants.

*
* *

Il s'agissait 15 fois de syndromes infectieux respiratoires dont une infection des voies aériennes supérieures, trois pleurésies ou pleuro-pneumopathies, et onze pneumopathies parmi lesquelles une pneumopathie compliquant une rougeole chez un sujet âgé.

L'apparition des anticorps a été observée dans trois cas plus particulièrement intéressants :

- une otite bulleuse chez un enfant
- un syndrome de Guillain-Barré
- une méningo-encéphalite avec agglutinines froides positives à titre élevé.

Les anticorps déviant le complément ont pu être titrés dans 16 de ces cas, et nous voyons que huit fois des titres élevés ou croissants ont été également observés.

Enfin, dans six cas, par inhibition de fermentation, le sérum précoce était inférieur à 1/8 et le sérum tardif égal à 1/8. L'intervalle entre les deux sérums variait de 4 à 15 jours et nous n'avons pu obtenir de sérums ultérieurs. Ces 6 cas n'ont donc pu être pris en considération.

Un résumé des douze observations de malades hospitalisés à Claude Bernard fera l'objet du chapitre suivant.

BILAN DES CAS OU A ETE OBSERVEE UNE MONTEE FRANCHE DES ANTICORPS I.F.

N° d'inscription âge et hôpital	Diagnostic cliniq. date de début	Dates des sérums	Titre en AC.IF	Titre en AC.DC'	Hémagglutinines froides
67 00 44 Cl. Bernard (Lassen) O.P. 41 ans	Méningo-encéphalite 31.12.66	20.1.67 8.2.67 18.4.67	< 8 - 256	≥ 2048 - ≥ 2048	1024 256 négat.
68.17 10 Hérold R.M.	Pneumopathie aiguë à foyers multiples	8.11.68 19.1.69	32 128	épuisé épuisé	- -
69.03 14 Cl. Bernard (Tessier II) C.D. 3 ans	Pneumopathie 18.2.69	19.2.69 26.2.69	< 8 128	< 8 épuisé	- -
69.05 10 Hérold G. 11 mois	Pleuropneumonie	19.3.69 31.3.69	8 32	épuisé épuisé	- -
69.05 50 Gonesse B. 10 ans	Pleurésie séro-fibrineuse spontanément régressive non tuberculeuse	25.3.69 24.4.69	< 8 128	<8 antic. à ttes dilutions	- -
69.05 53 Cl. Bernard (Mourier) P.A. 61 ans	Pneumopathie dans suites de rougeole 23.3.69	25.3.69 3.4.69	< 8 256	<8 <8	négat. -
69.07 89 Bretonneau H.B.	Pleuropneumopathie 28.3.69	12.4.69 24.4.69	< 8 128	256 ≥ 1024	- -
69. 08 82 Cl. Bernard (Tessier II) C.N. 3 ans	Pneumopathie	29.4.69 8.5.69	< 8 32	épuisé épuisé	- négat.

69.11 40 Cl. Bernard (Mourier) P.H. 29 ans	Pneumopathie post radiothérapique au cours d'un Hodgkin 15.5.69	23.5 11.6	< 8 256	< 8 < 8	négativ. -
69. 13 53 C.Hosp. région. de Toulouse B.D.	-	16.5.69 30.5.69 4.6.69	64 256 128	≥ 1024 ≥ 1024 ≥ 1024	- - -
69. 14 17 Cl. Bernard (Lassen) C.P. 33 ans	Syndrome de Guillain-Barré 19.6.69	25.6.69 18.7.69	< 8 512	< 8 < 8	négativ. -
69. 14 65 Cl. Bernard (Letulle) M. 5 ans	Pneumopathie base droite	30.6.69 5.7.69	512 2048	< 8 < 8	négativ. négativ.
69. 15 95 Cl. Bernard (Mourier) S.A. 4 ans	Otite bulleuse 14.7.69	21.7.69 29.7.69	< 8 32	32 32	négativ. négativ.
69.16 87 Bretonneau G. 12 ans	Foyer paracardiaque gauche	31.7.69 11.8.69	64 256	≥ 512 ≥ 512	- -
69. 22 09 Cl. Bernard (Tessier II) B.J. 7 ans 1/2	Bronchite coqueluchoïde et sinusite 1.11.69	14.11.69 29.11.69	16 2048	256 épuisé	≥ 2048 -
69.22 20 Cl. Bernard (Mourier) B.A. 27 ans	Pneumopathie atypique 12.11.69	15.11.69 19.11.69 29.11.69	< 8 256 256	épuisé 128 256	négativ. négativ. négativ.
69.24 07 Cl. Bernard (Mourier) S.D. 25 ans	Infections des voies aériennes supérieures 2.12.69	9.12.69 20.12.69	< 8 256	< 8 < 8	- -
69.24 26 Cl. Bernard (Tessier II) C.M. 55 ans	Parotidite non ourlienne et pneumopathie 8.12.69	12.12.69 24.12.69	< 8 128	< 8 < 8	≥ 512 ≥ 512
69.25 03 St André de Bordeaux	-	20.11.69 20.12.69	64 1024	épuisé épuisé	- -
69.25 13 Cl. Bernard (Lassen) B.P. 48 ans	Pneumopathie "grippale" 7.12.69	22.12.69 7.1. 70	< 8 32	< 8 8	128 négativ.

N° 67.0044

Mr P.O., âgé de 41 ans, est hospitalisé dans le service du Pr VIC DUPONT le 18 janvier 1967 pour un coma vigil apparu depuis 4 jours au cours d'une méningo-encéphalite.

Le début de la maladie remonte au 31 décembre 1966; ce jour-là, le malade est pris d'un malaise général avec courbatures, myalgies diffuses; cet état se prolonge jusqu'au 13 janvier, date à laquelle il a des céphalées violentes et présente des troubles psychiques. Durant cet intervalle de temps, il ne fait pas de crises convulsives et, d'après sa femme, il aurait présenté une paralysie passagère de l'hémiface gauche et du membre supérieur gauche. Il est à noter que le 14 décembre, sa femme avait présenté un syndrome grippal avec de la fièvre pendant 8 jours et des myalgies ayant cédé spontanément, et que sa belle-mère avait ressenti les mêmes troubles 8 jours après.

Le 15 janvier, il entre à l'hôpital de Melun; il a une paralysie faciale gauche qui disparaît le lendemain, ses réflexes ostéo-tendineux (R.O.T.) sont très vifs et symétriques, il a une respiration de Cheyne-Stocks et un myosis bilatéral. Le reste de l'examen est normal, il n'a pas de raideur de la nuque ni de signe de Kernig.

Les 16 et 17 janvier, deux ponctions lombaires donnent des résultats discordants et contestés; de toute manière, le liquide céphalo-rachidien est très purulent, contient de nombreux éléments avec 90 % de polynucléaires, mais on n'a pas retrouvé de germes. Le malade reçoit 20 millions de Pénicilline, 3 millions de Colimycine, de la Gantrisine et 100 mg d'hémisuccinate d'hydrocortisone; malgré ce traitement, il est toujours fébrile, sa température oscille entre 37° et 38° pendant tout son séjour à Melun.

Le 18 janvier, le malade est dans un coma vigil; sans vraiement présenter de signes méningés, il est un peu raide, et il a un encombrement trachéo-bronchique important nécessitant trachéotomie et assistance ventilatoire dès son arrivée à Claude Bernard. Sa température est à 36°2 et, en dehors des troubles de la conscience et des R.O.T. vifs et diffusés, il n'a aucun signe neurologique. La P.L. faite à l'entrée ramène un liquide clair, coulant goutte à goutte et normal. On prescrit de la pénicilline et du Solnicol pendant 4 jours, puis 8 comprimés par jour de Pénicline. La courbe de température, qui le 4ème jour avait dessiné un clocher à 39°, oscille par la suite

entre 36°5 et 38°. On envisage les hypothèses de méningite cloisonnée, d'intoxication, d'hématome sous-dural mais surtout de méningo-encéphalite. En effet, plaident en faveur de ce diagnostic :

- le contexte épidémiologique et le début pseudogrippal de la maladie;
- la courte durée de la réaction méningée et l'absence de signes neurologiques de localisation.

Petit à petit, l'état de conscience s'améliore pour redevenir normal le 31 janvier. A cette date, il a également retrouvé une respiration autonome.

La pénicline est arrêtée le 8 février; quand il sort, le malade est dans un état psychique normal mais présente une astasie-abasie qui régresse lentement par la suite.

Divers examens de laboratoire ont été faits à la recherche d'une étiologie possible :

- Les recherches de B.K. sont restées négatives.
- Les sérodiagnostics de grippe, d'infections à para-influenzae I et à adénovirus sont négatifs le 24 janvier, de même que les sérodiagnostics d'ornithose et de psittacose.
- Un prélèvement de gorge inoculé sur cellules rénales de singe ne provoque aucun effet cytopathogène (20 janvier 1967).
- La recherche d'agglutinines froides est :
  - . positive au 1/1024 le 24 janvier
  - . positive au 1/256 le 8 février
  - . négative le 21 avril.
- Le sérodiagnostic des infections à M. Pneumoniae décèle une montée des anticorps inhibant la fermentation du glucose : le sérum du 6 février est inférieur au 1/8 et celui du 18 avril titre à 1/256.

Par déviation du complément, on démontre dans ces deux sérums un titre de 1/2048, donc élevé et stable.

La culture du L.C.R. sur milieu de Hayflick tentée le 6 février n'a pas permis l'isolement de M. Pneumoniae.

N° 69.0314

L'enfant C... Daniel, âgé de 3 ans, est hospitalisé le 18 février 1969 dans le service du Pr BASTIN pour toux et fièvre à 40°. Cet enfant est fatigué depuis quelques semaines et fébrile depuis trois jours. Il a déjà eu la coqueluche, les oreillons, la rougeole, la varicelle, plusieurs otites, et il a été vacciné par le B.C.G.

A l'entrée, sa langue est saburrale, ses amygdales un peu augmentées de volume, mais il ne présente pas d'angine. L'examen physique pulmonaire est normal, mais la radiographie montre une opacité diffuse du champ gauche. On prescrit aussitôt 0,75 g de Tétracycline qui provoque une défervescence rapide.

On ne trouve pas de streptocoque hémolytique dans la gorge (19 février). Le prélèvement de gorge et l'extrait de selles inoculés sur cellules rénales de singe, sur cellules Kb et sur cellules diploïdes humaines n'ont provoqué aucun effet cytopathogène (19 février).

Le sérodiagnostic des infections à M. Pneumoniae par inhibition de la fermentation du glucose montre qu'un sérum du 19 février a un titre inférieur au 1/8 alors qu'un sérum du 26 février titre à 1/128.

Cet enfant a sans doute présenté une pneumopathie gauche à M. Pneumoniae. Toutefois, la preuve formelle de l'étiologie ne pouvait être donnée que par l'isolement du germe qui n'a pas été tenté.

*
* *

N° 69.0553

Mme P... A., âgée de 61 ans, est hospitalisée le 24 mars 1969, chez le Pr BASTIN pour une rougeole. Malgré son âge certain, on ne lui connaît pas d'antécédent de cette maladie, et cette contamination tardive s'explique par le fait q'employée de maison chez un couple qui a deux enfants, elle s'est trouvée en contact avec une petite fille de 4 ans qui venait de faire la rougeole.

L'éruption apparaît le 23 mars; le diagnostic de rougeole est confirmé sérologiquement : dans un sérum du 25 mars, les anticorps inhibant l'hémagglutination titrent 1/160 et dans un sérum du 3 avril 1/640. De plus, la malade présente un foyer pulmonaire de la base droite confirmée radiologiquement.

Les recherches de BK et les recherches virales pour expliquer ce foyer sont négatives : ont été pratiqués des sérodiagnostics par déviation du complément pour la grippe, les infections à para influenzae et à adénovirus. Les hémocultures sont restées stériles. La recherche d'agglutinines froides est négative le 24 avril. Le sérodiagnostic des infections à Mycoplasma Pneumoniae décèle une montée des anticorps inhibant la fermentation du glucose : le sérum du 25 mars est inférieur au 1/8 et celui du 3 avril titre 1/256.

Par ailleurs, la température qui était à 40° à l'entrée, est rapidement revenue à la normale sous l'effet de 2 g de tétracycline quotidiens.

L'isolement de M. Pneumoniae n'a pas été tenté.

Il est à signaler que l'évolution ultérieure de la maladie a comporté une phlébite le 4 avril.

*
* *

N° 69.0882

L'enfant C... Nathalie, âgée de 3 ans, est hospitalisée le 26 avril dans le service du Pr BASTIN pour une pneumopathie.

Le début remonte au 5 avril par une otalgie gauche, de la toux, et une température à 39°5, 40°. Elle est hospitalisée cinq jours à Lagny, sa fièvre baisse, mais 2 jours après sa sortie, la température remonte de nouveau à 39°6. Elle présente un écoulement purulent des yeux et du nez, de l'otalgie, une dysphagie et de la toux. 1 g de totapen reste sans effet et devant la persistance des symptômes, elle est hospitalisée.

Il faut noter que depuis qu'elle est malade, sa petite soeur de 17 mois présente les mêmes symptômes ainsi que deux enfants de son immeuble, dont l'un a une otite.

A l'entrée, ses amygdales sont rouges et augmentées de volume; la langue est un peu rouge, dépapillée par plaque; elle a des ganglions sous-maxillaires bilatéraux inflammatoires et un ganglion sous-occipital droit. Le reste de l'examen et la radiographie pulmonaire sont normaux.

On lui donne à nouveau du totapen, et, dès le 30 avril, elle ne tousse plus, sa température est à 37°. Le totapen est arrêté le 5 mai et le 7, elle présente un clocher fébrile à 39°8; l'état général est bon, mais elle a une stomatite intense, une angine et un signe de Koplick droit. La sérologie confirme le diagnostic de rougeole en montrant une montée des anticorps inhibant l'hémagglutination (le sérum du 12 mai titre à 1/40 et celui du 20 mai à 1/160.

On a recherché l'étiologie de l'épisode initial. Les sérodiagnostics de grippe, d'infections à para influenzae I, à adénovirus, de psittacose et d'ornithose sont négatifs (5 mai). La recherche d'agglutinines froides est négative (5 mai). Le prélèvement de gorge et l'extrait de selles inoculés sur cellules rénales de singe, cellules Kb et cellules diploïdes humaines ne provoquent aucun effet cytopathogène (27 avril).

Le sérodiagnostic des infections à Mycoplasma Pneumoniae par inhibition de la fermentation du glucose montre, dans le sérum du 19 avril, un titre inférieur au 1/8 et dans le sérum du 8 mai, un titre au 1/32. Nous n'avons pas tenté l'isolement du germe.

N° 69.1140

Monsieur H... P., âgé de 29 ans, est hospitalisé le 13 février 1969 dans le service du Pr BASTIN pour des adénopathies cervicales droites apparues brutalement en janvier 1969. Dans ses antécédents, il faut noter un R.A.A. responsable d'une insuffisance mitrale discrète.

Une exérèse ganglionnaire révèle une maladie de Hodgkin au stade I qui est traitée par cobaltothérapie du 15 mars au 14 mai à l'Hôpital Necker chez le Dr A.N. LOISEAU.

Le 15 mai, le malade se met à tousser, a des frissons, ressent un point de côté de la région scapulaire gauche et sa température est à 38°7. Son médecin lui prescrit un million de Bipénicilline par jour pendant trois jours, ce qui est sans effet.

Il est à nouveau hospitalisé chez le Pr Bastin le 21 mai 1969. On discute plusieurs hypothèses :

1°) Une reprise évolutive de la lymphoréticulose. Elle semble peu probable car la cobaltothérapie vient d'être terminée et il n'y a pas de nouveaux signes.

2°) Une reprise évolutive du R.A.A., mais il n'y a pas de remaniement cardiaque et les tests inflammatoires sont légèrement perturbés.

3°) Une endocardite d'Osler : elle semble peu vraisemblable; toutes les hémocultures sont restées négatives.

L'auscultation des poumons ne décèle aucun signe en foyer, mais la radiographie montre une opacité hilifuge droite.

L'hypothèse la plus probable est donc une surinfection sur un poumon post-radiothérapique.

On prescrit 2 g de tétracycline, mais la fièvre persiste et au 6ème jour du traitement, on le met au Cortancyl qui entraîne une amélioration et une baisse de la fièvre.

Diverses étiologies sont recherchées. Les réactions tuberculiniques sont négatives. Les sérodiagnostics de l'ornithose et de la psittacose

(25 mai) et le sérodiagnostic de Wright (17 février - 28 mai) sont négatifs. Les hémocultures et les recherches de BK ne donnent aucun résultat. La recherche d'agglutinines froides (23 mai) est négative. Les sérodiagnostics par déviation du complément pour la grippe et les infections à para influenzae I (23 mai) et à adénovirus (23 mai et 16 juin) sont également négatifs. L'inoculation d'un prélèvement de gorge et d'un extrait de selles, sur cellules rénales de singe, sur cellules Kb et sur cellules diploïdes humaines (souche WI 38), ne provoquent aucun effet cytopathogène (23 mai).

Le sérodiagnostic des infections à Mycoplasma Pneumoniae révèle une montée des anticorps inhibant la fermentation du glucose : le titre du sérum du 23 mai est inférieur au 1/8 alors que celui du 11 juin atteint 1/256.

Nous n'avons pas tenté l'isolement du germe.

*
* *

N° 69.1417

Mr C... P., âgé de 33 ans, est hospitalisé le 24 juin 1969 dans le service du Pr VIC DUPONT pour une polyradiculonévrite avec quelques troubles respiratoires.

Il est en mission à Moscou quand commence sa maladie; il a présenté en janvier et juin 1969 deux épisodes grippaux sévères dont le second fut rapidement suivi d'un syndrome parétique évolutif. A son arrivée, le malade est quadriplégique avec abolition des réflexes tendineux, il présente des troubles sensitifs et des paresthésies. Le diagnostic évoqué est celui de syndrome de Guillain et Barré. L'apparition de troubles de la déglutition et de troubles respiratoires importants commande trachéotomie et mise sous respiration artificielle le 27 juin. La ponction lombaire pratiquée à cette date montre une dissociation albumino-cytologique (albumine = 0,90 g et présence de 2 éléments par mm3).

La recherche de germes dans le liquide céphalo-rachidien est négative. A partir du 5 juillet, la force musculaire s'améliore progressivement et le malade retrouve une respiration autonome le 4 août.

Quand, le 22 septembre, il part dans une maison de rééducation, le déficit moteur persiste au maximum au niveau des loges antéro-externes des deux membres inférieurs et, à ce niveau, il y a encore des troubles de la sensibilité profonde.

Différentes enquêtes étiologiques, notamment virales, n'ont rien apporté. Le titrage des anticorps neutralisant des 3 types de polio-virus montre un état d'immunité = 160 pour le type 1, 160 pour le type 2, 80 pour le type 3 (25 juillet). Les diagnostics de la grippe, des infections à para influenzae I et à adénovirus sont négatifs (30 juin). Le prélèvement de gorge inoculé sur cellules rénales de singe, sur cellules Kb et sur cellules diploïdes humaines n'a provoqué aucun effet cytopathogène (26 juin). Les diagnostics de l'ornithose et de la psittacose sont douteux au 1/40 (30 juin). La recherche d'agglutinines froides est négative (30 juin). Les hémocultures sont stériles.

La sérologie des infections à Mycoplasma Pneumoniae décèle une montée des anticorps inhibant la fermentation du glucose = un sérum du 25 juin a un titre inférieur au 1/8 et un sérum du 18 juillet titre à 1/512. L'isolement du germe n'a pas été tenté.

N° 69.1595

L'enfant A... S., âgée de 4 ans, est hospitalisée le 19 juillet 1969 dans le service du Pr BASTIN pour une varicelle.

Celle-ci est apparue à l'hôpital de Meaux où l'enfant était en traitement pour une otite phlycténulaire droite traitée par paracentèse et terramycine. Elle a des antécédents d'otites, de bronchites, d'angines fréquentes et de coqueluche.

Le 22 juillet est observée une otite bilatérale qui justifie deux jours plus tard une double paracentèse ; une surinfection à pyocyanique est alors constatée, et bien qu'il soit résistant à la tétracycline, la prescription de cet antibiotique amène une défervescence rapide. L'examen pulmonaire physique et radiologique est normal.

Les recherches d'hémagglutinines froides sont négatives (les 21 et 29 juillet).

Le sérodiagnostic des infections à M. Pneumoniae par inhibition de la fermentation du glucose montre qu'un sérum du 21 juillet a un titre inférieur au 1/8, alors qu'un sérum du 29 juillet a un titre égal à 1/32; par la technique de déviation du complément, les deux sérums titrent 1/32.

L'isolement du germe n'a pas été tenté.

*
* *

N° 69.2209

L'enfant B... Jacques, âgé de 7 ans et demi, entre le 13 novembre 1969 dans le service du Pr BASTIN pour suspicion de coqueluche.

Hospitalisé à Bretonneau, il présente depuis 15 jours une toux non quinteuse, accompagnée d'expectorations glaireuses, et dont les accès provoquent parfois des vomissements; sa température est à 37°5.

Dans ses antécédents, il n'y a aucun épisode pulmonaire, pas de toux habituelle; il a été vacciné par le BCG et sa cuti est positive. L'examen des crachats ne montre qu'une flore banale.

A l'entrée, on observe une rhinite importante et de volumineuses adénopathies sus-angulo-maxillaires. Le reste de l'examen est normal, la gorge est propre; on trouve des adénopathies jugulo-carotidiennes, axillaires et inguinales plus banales; la température est à 37°.

La radiographie pulmonaire est normale, mais une radiographie des sinus pratiquée le 18 novembre confirme la suspicion d'une sinusite bilatérale. A partir de cette date, l'enfant reçoit 1,50 g de propiocine chaque jour, des aérosols de néomycine-hydrocortisone; puis un drainage bilatéral des sinus est suivi de l'administration in situ de chloramphénicol. Après l'ablation des drains, une radiographie de contrôle montre une rétention purulente. Un nouveau drainage immédiat étant impossible, l'enfant est dirigé vers Trousseau.

Le prélèvement de gorge et l'extrait de selles inoculés sur cellules rénales de singe, sur cellules Kb et sur cellules diploïdes humaines n'ont provoqué aucun effet cytopathogène (14 novembre).

La recherche d'agglutinines froides est positive à 1/2048 le 14 novembre.

Le sérodiagnostic des infections à M. Pneumoniae par inhibition de la fermentation du glucose montre qu'un sérum du 14 novembre titre à 1/16 alors qu'un sérum du 29 titre à 1/2048.

L'isolement de M. Pneumoniae n'a pas été tenté.

*
* *

N° 69.2220

Mr B... A., âgé de 27 ans, sans antécédents particuliers, entre le 14 novembre 1969 dans le service du Pr BASTIN pour un syndrome infectieux avec note méningée.

Le malade ressent en effet de vives céphalées depuis deux jours, sa température est à 38°, il a des myalgies, des arthralgies diffuses, des courbatures lombaires, il tousse mais ne crache pas.

A l'entrée, sa température est à 39°, la nuque est raide et il présente un signe de Kernig, sa gorge est très rouge, on provoque une douleur à la pression du sinus maxillaire droit et on entend des râles sibilants au sommet pulmonaire droit.

La ponction lombaire pratiquée à l'entrée ramène un liquide clair de formule normale.

La radiographie du sinus maxillaire droit est normale. Par contre, la radiographie pulmonaire montre une opacité triangulaire à sommet hilaire au niveau du lobe moyen du poumon droit. D'autre part, le malade présente une leucopénie à 4800.

L'association de la leucopénie et des myalgies évoque une pneumopathie atypique. Dès l'entrée, on prescrit de la tétracycline qui entraîne une défervescence rapide. Le malade se met à cracher deux jours plus tard, mais l'examen des crachats ne montre pas de flore prédominante. Une 2ème radiographie faite 10 jours après la première montre que l'image pulmonaire a presque disparu, mais on entend toujours des râles crépitants aux deux sommets.

Les sérodiagnostics de grippe, infections à para influenzae I, ornithose et psittacose sont négatifs (17 novembre); le prélèvement de gorge, l'extrait de selles et le LCR inoculés sur cellules rénales de singe, sur cellules Kb, sur cellules diploïdes humaines (souche WI 38) ne provoquent aucun effet cytopathogène (15 novembre).

Une intra-dermo réaction à la tuberculine à 10 unités provoque une papule indurée de 9 millimètres de diamètre; toutes les recherches de BK pratiquées sont négatives. Les recherches d'agglutinines froides sont également négatives (15, 19 et 29 novembre).

Le sérodiagnostic des infections à M. Pneumoniae par inhibition de la fermentation du glucose donne les résultats suivants :

- le sérum du 15 novembre a un titre inférieur au 1/8, et ceux du 19 et 29 novembre titrent à 1/256;
- par la technique de déviation du complément, le sérum du 19 novembre titre 1/128 et celui du 29 novembre 1/256.

Nous n'avons pas tenté d'isoler le germe.

*
* *

N° 69.2407

Mr S... D., Mauritanien, âgé de 25 ans, vivant en France depuis un an, est hospitalisé le 7 décembre 1969 chez le professeur BASTIN pour une douleur thoracique droite persistant depuis 5 jours, accompagnée d'une toux ramenant des crachats blanchâtres. Il n'a pas d'antécédents médicaux ni chirurgicaux.

A l'entrée, sa température est à 37°5, on trouve des adénopathies sous-maxillaires et axillaires gauches, on entend quelques râles crépitants prédominant à droite, mais la radiographie pulmonaire est normale. On conclut donc à une infection des voies aériennes supérieures sans atteinte parenchymateuse.

Dès son arrivée, il est mis à 6 millions par jour de Pénicilline; la fièvre baisse un peu, mais la défervescence thermique ne devient très nette que cinq jours plus tard, quand on adjoint au traitement 2 g de tétracycline.

Diverses recherches étiologiques se révèlent négatives :

- sérodiagnostics de la grippe, des infections à para influenzae I et à adénovirus (29 décembre);
- sérodiagnostics de l'ornithose et de la psittacose (29 décembre);
- recherche de BK.

Le sérodiagnostic des infections à M. Pneumoniae par la technique d'inhibition de la fermentation du glucose pratiquée sur des sérums du 9 et du 20 décembre décèle une montée d'anticorps du 1/8 au 1/256.

Nous n'avons pas tenté l'isolement du germe.

*
* *

N° 69.2426

Mr C... M., Polonais, âgé de 55 ans, est hospitalisé le 11 décembre 1969 dans le service du Pr BASTIN pour une parotidite bilatérale aiguë fébrile ayant débuté le 8 décembre 1969, mais il a déjà eu les oreillons en 1963.

Quatre jours plus tard, le malade ressent une douleur thoracique antérieure diffuse et sa fièvre atteint 39°. A l'examen pulmonaire, on trouve une matité de la base droite et de gros râles inspiratoires aux deux bases. La radiographie montre des opacités macro-nodulaires des deux bases. Devant ce tableau, on évoque le diagnostic de pneumopathie virale ou bactérienne.

D'autre part, le malade présente des phases d'agitation alternant avec des phases de prostration qui motivent une ponction lombaire, mais le liquide céphalo-rachidien est clair et de formule normale. On répète les hémocultures qui sont toujours négatives.

Après la prescription de tétracycline, le 18 décembre, on observe rapidement une régression de la parotidite, une amélioration des signes pulmonaires et de l'état général, bien qu'il persiste une toux importante et une expectoration. La fièvre baisse un peu mais ne disparaît complètement qu'après cinq jours de traitement.

Le sérodiagnostic ourlien donne un titre bas et stable d'anticorps confirmant une infection ancienne (les sérums du 11 et du 24 décembre titrent le 1/20). Le sérodiagnostic de Wright est négatif (22 décembre). Les sérodiagnostics de grippe et d'infections à para influenzae I sont négatifs (23 décembre).

Le prélèvement du canal de Sténon (11 décembre) inoculé sur cellules rénales de singe n'a provoqué aucun effet cytopathogène, de même que le prélèvement de gorge et l'extrait de selles (13 décembre) inoculés sur cellules rénales de singe, cellules Kb et cellules diploïdes humaines. Les recherches d'hémagglutinines froides sont positives au 1/512 les 12 et 24 décembre.

Le sérodiagnostic des infections à M. Pneumoniae montre une montée des anticorps inhibant la fermentation du glucose : le sérum du 11 décembre est inférieur au 1/8 alors que celui du 24 décembre titre à 1/128.

Nous n'avons pas essayé d'isoler le germe.

N° 69.2513

Monsieur B.P., âgé de 48 ans, est hospitalisé le 19 décembre 1969 dans le service du Pr VIC DUPONT pour une insuffisance respiratoire aiguë au cours d'une bronchopneumopathie.

Le début remonte au 7 décembre 1969 ; cet homme qui a des antécédents de bronchite chronique depuis 20 ans et souffre d'une dyspnée de décubitus permanente, présente brutalement une fièvre à 39°-40°, une dyspnée intense, une toux ramenant de nombreux crachats. Il est hospitalisé le 15 décembre à l'Hôpital Henri-Mondor de Créteil; on entend des râles crépitants aux deux bases et la radiographie pulmonaire montre des opacités réticulo-micronodulaires diffuses. Le maladie est en hypoxie (30 mm de Hg), en hypercapnie (27 mm de Hg) et le pH est à 7,5. L'examen des divers prélèvements n'ayant pas mis de germes en évidence, on pense qu'il s'agit d'une bronchopneumopathie d'origine virale ayant entraîné une insuffisance respiratoire aiguë. Les antibiotiques qu'il reçoit, thiophénicol et pénicilline, semblent inefficaces.

Le 18 décembre, le malade présente une éruption maculo-érythémateuse que l'on craint être une manifestation allergique à la pénicilline; on remplace donc celle-ci par du Keflin. Mais l'état du malade s'aggrave, il est cyanosé, polypnéique, en sueur et présente des troubles psychiques qui commandent sa mise sous oxygène. A l'hôpital Claude-Bernard où il a été transféré, il reçoit 1 g de Solnicol et 8 mg de Gentamycine. Le lendemain, l'administration de Soludécadron entraîne une nette amélioration, mais le malade reste subfébrile. Les jours suivants, il redevient lucide, son expectoration s'est pratiquement tarie; on entend toujours des râles fins diffus dans les deux champs pulmonaires.

Après un épisode d'emphysème sous-cutané de la base du cou, interprété comme la conséquence de la rupture d'une bulle d'emphysème au niveau d'une symphyse pleurale, l'évolution est favorable et les antibiotiques sont supprimés le 6 janvier 1970.

La sérologie par déviation du complément pour le diagnostic de la grippe de type A et des infections à para influenzae I est positive au 1/80, mais le titrage n'a été fait que sur le sérum du 14 janvier; ce résultat qui est en fait assez banal ne possède donc que peu de valeur indicative.

Les sérodiagnostics de l'ornithose, de la psittacose et des infections à adénovirus sont négatifs (14 janvier). Le prélèvement de gorge et l'extrait de selles inoculés sur cellules rénales de singe, sur cellules Kb et sur cellules diploïdes humaines ne provoquent aucun effet cytopathogène (6 janvier).

Les recherches de BK sont restées négatives.

La recherche d'agglutinines froides est positive au 1/128 le 22 décembre et négative le 7 janvier.

Des sérums du 22 décembre 69 et du 7 janvier 70 titrés en inhibition de fermentation du glucose pour le sérodiagnostic des infections à Mycoplasma Pneumoniae ont, le premier un titre inférieur au 1/8, et le deuxième un titre égal à 1/32.

L'isolement du germe n'a pas été tenté.

*
* *

2 - Etude des cas où un titre stable d'anticorps inhibant la fermentation du glucose a été démontré.

Onze fois nous avons obtenu des titres stables. Il est à remarquer qu'un certain nombre de ces paires de sérums avaient été prélevées à un intervalle de temps très réduit lors de l'hospitalisation et que le plus souvent elles étaient assez proches du début de la maladie. Les titres obtenus sont peu élevés.

Il peut s'agir d'une cicatrice immunologique témoin d'une infection ancienne ou d'une immunisation en cours. En faveur de cette dernière interprétation, nous avons démontré deux fois, dans ces mêmes paires de sérum, la présence d'anticorps déviant le complément dont on sait qu'ils témoignent plus volontiers d'une infection relativement récente.

*
* *

N.B. - Nous avons inclus dans le tableau suivant trois paires de sérum présentant une différence de titre d'une dilution entre les sérums précoce et tardif car on ne peut accorder de valeur certaine à cette faible différence.

BILAN DES PAIRES DE SERUMS POSSEDANT DES ANTICORPS A TITRE STABLE

N° inscription âge - hôpital	Diagnostic clinique Date de début	Dates des sérums	Titre en AC. IF	Titre en AC. DC'	Hémagglutinines froides
69. 21 80 Hôpital de Gonesse L. 12 ans	Pneumopathie base gauche	8. 11.69 22.11.69	64 64	128 64	≥ 512 ≥ 512
69.05 31 Cl. Bernard (Laveran) M.M. 4 ans	Pneumopathie	22.3.69 26.3.69	16 16	- -	- -
69.00 67 Cl. Bernard (Roux) B. 22 ans	Pleurésie	13.1.69 18.1.69	32 32	16 16	- -
68.19 34 Cl. Bernard (Tessier II) L.L.	Fièvre - toux	30.12.68 10.1.69	32 32	- -	- -
68.18 92 Cl. Bernard (Tessier II) J.	Foyer pulmonaire droit	20.12.69 27.12.69	8 8	- -	- -
68.17 91 Cl. Bernard (Mourier) B.C. 15 mois	Pneumopathie	28.11.69 9.12.69	16 8	- -	- -
68.16 31 Hérold N.	Angine et foyer du lobe supérieur gauche	29.10.69 12.11.69	32 32	- -	- -
68.15 96 Cl. Bernard (Tessier II)	Suspicion de Stevens-Johnson	25.10.69 2.11.69	8 8	- -	- -
68.14 58 Cl. Bernard (Roux)	Syndrome méningé	1. 10.69 19.10.69	32 32	- -	- -

68.19 42 Cl. Bernard (Tessier II)	Stevens-Johnson	31.12.68 6. 1.69	16 32	- -	- -
69.25 09 Cl. Bernard (Mourier) M.	Pneumonie atypique	24.12.69 31.12.69	16 8	<8 8	- -

3 - Bilan des paires de sérum témoignant d'une baisse des anticorps inhibant la fermentation

Dans quatorze paires de sérum, nous avons observé que le sérum tardif avait un titre inférieur à celui du sérum précoce et que, souvent même, on ne pouvait y déceler la présence d'anticorps à la dilution 1/8. Ceci nous posait donc des problèmes d'interprétation difficiles.

Le titre du sérum précoce étant souvent peu élevé, notre première réaction fut de méfiance, et nous avons pensé que ces titres de 1/16 ou 1/32 étaient dûs à des inhibiteurs non spécifiques. Dans trois cas, les sérums se sont avérés anti-complémentaires ou étaient hémolysés. Dans trois autres cas, la présence d'anticorps déviant le complément, voire leur ascension ou leur baisse, donne à penser qu'une infection à M. Pneumoniae est en cause.

*
* *

BILAN DES PAIRES DE SERUM TEMOIGNANT D'UNE BAISSE DES ANTICORPS INHIBANT LA FERMENTATION

N° inscription Age - Hôpital	Diagnostic clinique Date de début	Dates des sérums	Titre en AC. IF	Titre en AC. DC'
69.23 97 Cl. Bernard (Mourier) B.		8.12.69 17.12.69	16 8	Anti C.au $\frac{1}{16}$ 8
69.22 51 Hérold G. 2 ans 1/2	Pneumopathie "virale"	18.11.69 26.11.69	16 8	8 1024
69.15 15 Claude Bernard (Mourier) G.		4.7.69 15.7.69	32 8	8 8
69.12 97 Cl. Bernard (Chantenesse)	Foyer pulmonaire droit et épanchement pleural bilatéral	12.6.69 23.7.69	16 8	- -
69.13 77 Foch	Pneumonie atypique	18.6.69 11.7.69	32 (hémolysé) 8	8 8
69.01 82 Hérold D.	Bronchopathie secondaire à une rougeole	30.1.69 13.2.69	256 32	64 16
69.25 51 Cl. Bernard (Tessier II) D.	Céphalée - Angine - Adénopathies - Eruption.	26.12.69 9. 1.70	256 8	16 16
68.19 26 Cl. Bernard (Mourier A.M. 5 mois $\frac{1}{2}$	Pneumonie atypique	26.12.68 7. 1.69	16 8	8 épuisé
68.16 05 Cl. Bernard (Roux) A.N.	Conjonctivite - Fièvre - Arthralgies	25.10.69 4.11.69	256 128	8 8

68.14 19 Cl. Bernard (Tessier II)	Ectodermose pluri-orificielle fébrile	20.9.69 27.9.69	32 <8	<8 <8
68.03 80 Cl. Bernard (Lassen) M.A. 39 ans	Guillain-Barré 12.2.68	16.2.68 1.3.68	256 (hémo-lysé) 16	épuisé 8
67.01 46 Cl. Bernard (Lassen) B.M. 20 ans	Guillain-Barré 24.2.67	6.3.67 21.3.67	128 (hémo-lysé) <8	Anti C au 1/16 <8
69.22 23 Cl. Bernard (Mourier) M.		15.11.69 4.12.69 17.12.69	256 <8 <8	Antic. au 1/32 Antic. au 1/16 Antic. au 1/16

4 - Bilan des sérums isolés inhibant la fermentation du glucose par M. Pneumoniae

51 sérums, hélas, isolés, inhibaient la fermentation du glucose par M. Pneumoniae.

Les titres obtenus se répartissent ainsi :

Titre	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$
Nombre de sérums	11	13	7	8	5	5	1	1

Nous pensons, du fait du contexte clinique, que les quatre cas suivants sont des infections en cours d'évolution, et il est bien dommage que l'absence de sérum tardif ne nous ait pas permis de le démontrer

N° inscription âge - hôpital	Diagnostic clinique Date de début	Date des sérums	Titre en AC. IF	Titre en AC. DC	Hémag. froides
68.17 57 Cl. Bernard (Tessier II) O.F. 8 mois	Foyer pulmonaire atypique	22.11.68	1024	< 8	négat.
69.01 31 Boucicaut	Episode grippal début janvier puis mal asthmatique et troubles du rythme	23.1.69	64	64	$\geqslant 2048$
68.18 18 Hérold C.H. 18 mois	Pneumopathie aiguë à foyers multiples et otite	3.12.68	64	-	-
69.19 79 Hôpital de Gonesse R.J. 4 ans 1/2	Opacité aiguë cardiophrénique droite	9.10.69	16	64	-

5 - Bilan des sérums ne possédant pas d'anticorps inhibant la fermentation du glucose à la dilution 1/8

Nous avons titré 57 paires de sérum dans lesquelles nous n'avons pas décelé d'anticorps.

Leurs origines sont les suivantes :

20 pneumopathies et pleuropneumopathies
4 méningites ou méningoencéphalites
3 péricardites
10 syndromes de Guillain-Barré
2 érythèmes polymorphes
2 maladies éruptives
1 laryngite
1 anémie hémolytique
2 fièvres sans diagnostic
12 cas dont la clinique nous est totalement inconnue, mais pour lesquels le titrage des anticorps avait été demandé par les cliniciens.

Nous avons titré également 90 sérums qui sont restés, hélas, isolés, et dans lesquels nous n'avons pas décelé d'anticorps.

*
* *

VII - CONCLUSION

Pour répondre aux besoins des services hospitaliers qui désirent disposer d'une sérologie spécifique des infections à Mycoplasma Pneumoniae, nous avons été amenée à étudier les diverses et nombreuses techniques sérologiques proposées ces dernières années pour leur diagnostic.

Tous les auteurs sont d'accord pour reconnaître la plus grande fidélité à l'immunofluorescence indirecte, utilisant comme antigène des coupes d'embryon de poulet infecté, mais cette méthode n'est pas de pratique courante.

Si la sérologie par déviation du complément est intéressante par sa rapidité et, pour le diagnostic des infections récentes, par la précocité d'apparition de ce type d'anticorps, elle semble être souvent défaillante; elle ne décèle que 75 % des infections récentes, et des infections certaines à M. Pneumoniae ne s'accompagnent pas de l'apparition d'anticorps déviant le complément, alors que s'élaborent des anticorps inhibant la croissante du germe. Les antigènes déviant le complément vendus dans le commerce ne permettent de déceler qu'un nombre limité d'infections; nous n'en avons personnellement qu'une brève expérience. La préparation de ces antigènes au laboratoire est possible, mais elle est laborieuse et nécessite de toute façon l'obtention de cultures du germe titrant des chiffres élevés.

Nous avons donc réalisé le titrage des anticorps sériques par un test d'inhibition de croissance du germe, cette inhibition étant révélée par la non fermentation du glucose. Jusqu'à présent, cette méthode a été peu pratiquée en raison des difficultés techniques de sa réalisation et de sa standardisation. En fait, comme nous l'avons constaté, elle est d'une grande simplicité et parfaitement reproductible, qualités non négligeables pour une technique sérologique appelée à se généraliser. Nous avons montré que sa spéficité peut être défaillante quand les sérums sont hémolysés, voire anticomplémentaires.

Nous avons titré les anticorps inhibant la fermentation du glucose par Mycoplasma Pneumoniae dans 348 sérums appartenant à 243 malades. Environ 33 % possédaient des anticorps de ce type. Nous avons décelé une ascension significative des anticorps dans 20 cas dont nous rapportons les observations cliniques, et apporté des arguments important au diagnostic étiologique d'une méningo-encéphalite avec agglutinines froides.

Cependant, nous n'ignorons pas que de telles observations sont incomplètes sans l'isolement du germe à partir du pharynx ou des voies respiratoires; ce travail constitue l'étape ultérieure du programme que nous nous proposons de réaliser.

*

* *

Vu, le Président de Thèse
D. CHRISTOL

Vu, le Doyen de la Faculté
G. BROUET

Vu et permis d'imprimer
le Recteur de l'Académie de Paris,
G. MALLET

BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXANDER E.R., FOY H.M., KENNY G.E., KRONMAL R.A., Mc MAHAN R., CLARKE E.R., Mac COLL W.A. et GRAYSTON J.T.
   Pneumoniae due to Mycoplasma pneumoniae. Its incidence in the membership of a co-operative medical group.
   New Engl. J. Med., 1966, 275 131 - 136

2. ANDREWS B.E.
   Human infections with Mycoplasma pneumoniae (Eaton's agent)
   Proc. Roy. Soc. Med. 1965 58 80 - 82

E. ARAI S., YOSHIDA K., IZAWA A., KUMAGAI K. et ISHIDA N.
   Effects of antibiotics on growth of Mycopasma pneumoniae MAC.
   J. Antibiot. A., Jap. 1966 19 118 - 120

4. BAERNSTEIN H.D., TREVISANI E., AXTELLS. et QUILLIGAN J.J. Jr.
   Mycoplasma pneumoniae (Eaton atypical pneumoniae agent) in children's respiratory infections.
   J. Pediat. 1965, 66, 829 - 837

5. BALASSANIAN N. et ROBBINS F.C.
   Mycoplasma pneumoniae infections in families
   New Engl. J. Med. 1967, 277, 719 - 725

6. BAYLEY J.S., CLARK H.W., FELTS W.R., FOWLER R.C., BROWN T. Mc.P.
   Antigenic properties of PPLO from tissue cell cultures and the human genital area.
   J. Bact. 1961, 82, 542 - 547

7. BAYLEY J.S., CLARK H.W., FELTS W.R., BROWN T. Mc P.
   Growth inhibitory properties of Mycoplasma antibody
   J. Bact. 1963, 86, 147

8. BECKMAN B.L., KENNY G.E.
   Immunochemical analysis of serologically active lipids of Mycoplasma pneumoniae
   J. Bact. 1968, 96, 1171 - 1180

9. BIBERFELD G., JOHNSSON T., JONSSON J.
   Studies on Mycoplasma pneumoniae infection in Sweden.
   Acta path. and microbiol. Scandinav. 1965, 63, 469 - 475

10. Biology of the Pleuro - Pneumonia like organims.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1960 - 79 - 305-758

11. BOSSAHRD Sylvie
Valeur de la réaction de fixation du complément pour la détection des infections à Mycoplasma pneumoniae
Thèse 1968 - Lyon

12. BOYDEN S.V.
The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.
J. Exp. 1951 - 93 - 107 120

13. BRADSTREET CMP, TAYLOR CED
Technique of complement fixation test applicable to the diagnosis of virus diseases
Monthly bull. Min. Health and Publ. Health Lab. Serv. 21
1962 - 96 - 104

14. CANNEL H., CHURCHER G.M., and MILTON - THOMPSON G.J.
Stevens Johnson Syndrome associated with Mycoplasma pneumoniae Infections.
Br. J. Derm. 1969 - 81 - 196

15. CHANOCK R.M., COOK M.K., FOX H.H., PARROT R.H., HUEBNER R.J.
Serologic evidence of infection with Eaton agent in lower respiratory illness in childhood.
New Engl. J. Med., 1960 - 262 - 648 - 654

16. CHANOCK R.M., FOX H.H., JAMES W.D., BLOOM H.H., MUFSON M.A.
Growth of laboratory and naturally occurring strains of Eaton agent in monkey kidney tissue culture
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med 1960 - 105 - 371

17. CHANOCK R.M., MUFSON M.A., BLOOM H.H., JAMES W.D., FOX H.H., KINGSTON J.R.
Eaton agent pneumonia. I. Ecology of infection in a military recruit population
J. Am. Med. Assoc. - 1961 - 47 - 887 - 890

19. CHANOCK R.M., HAYFLICK L., BARILE M.F.
Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumoniae and its identification as a PPLO
Proc. Natl. Acad.Sci. - 1962 - 48 - 41 - 49

20. CHANOCK R.M., JAMES W.D., FOX H.H., TURNER H.C., MUFSON M.A., HAYFLICK L.
Growth of Eaton PPLO in Broth and preparation of a complement fixing antigen.
Proc.Soc. Exptl. Biol. Med. - 1962 - 110 - 884 - 889

21. CHANOCK R.M., MUFSON M.A., JAMES W.D., FOX H.H., BLOOM H.H.
Recovery of PPLO of a typical pneumocia on artificial agar medium.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. - 1962 - 110 - 543 - 547

22. CHANOCK R.M., MUFSON M.A., SOMERSON N.L., COUCH R.B.
Role of Mycoplasma (PPLO) in human respiratory disease
Amer. Rev. resp. Dis., 1963 - 88 - 218

23. CLYDE W.A., DENNY F.W., DINGLE J.H.
J. Lab. Clin.Med. - 1960 - 56 - 799 - 804

24. CLYDE W.A., DENNY F.W., DINGLE J.H.
Fluorescent stainable antibodies to the Eaton agent in human primary atypical pneumonia transmission studies
J. Clin. Invest. - 1961 - 40 - 1638 - 47

25. CLYDE W.A.
Hemolysis in identifying Eaton's pleuro-pneumonia like organism
Science 1963 - 139 - 55

26. CLYDE W.A.
Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera
J. Immunology - 1964 - 92 - 958 - 965

27. CONANT R.M., BARRON A.L., MILGROM F.
Gel precipitation with ECHO 4 and other enteroviruses
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1966 - 121 - 307 - 311

28. CONANT R.M., SOMERSON N.L., SENTERFIT L.B.
Immunodiffusion reactions between human sera and Mycoplasma pneumoniae
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. - 1968 - 129 - 401 - 407

29. COOK M.K., CHANOCK R.M., FOX H.H., HUEBNER R.J., BUESCHER E.L., JOHNSON R.T.
Role of Eaton agent in disease of lower respiratory tract. Evidence for infection in adults.
British Med. J. - 1960 - 1 - 905 - 911

30. COPPS S.C., ALLEN V.D., SVELTMANN S., EVANS A.S.
A community outbreak of Mycoplasma pneumoniae
J. A. M. A. - 1968 - 204 - 123 - 128

31. COUCH T.R., CATE M.D., CHANOCK R.M.
Infection with artificially propagated Eaton agent (Mycoplasma pneumoniae)
J. A. M. A. - 1964 - 187 - 146 - 151

32. CROWLE A.J.
"Immuno Diffusion"
Academic Press, New York, 1961.

33. DACIE J.V.
The Haemolytic Anaemias, 1962 - 2ème edition - 343 and 494
Churchill, London.

34. DEL GUIDICE R.A., PAVIA R.
Hemadsorption of Mycoplasma pneumoniae and its inhibition with sera from patients with primary atypical pneumonia
Bact. Proc. 1964, 71.

35. DOWDLE W.R., ROBINSON R.Q.
An indirect hemagglutination test for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1964, 116 947 - 950

36. DOWDLE W.R., STEWART J.T., HEYWARD and ROBINSON R.Q.
Mycoplasma pneumoniae infection in a children's population = a five year study.
Am. J. Epidemiol. 1967, 85, 137

37. DULBECCO R., VOGT M.
One step growth curve of western equine encephalomyelitis virus on chicken embryo cells grown in vitro and analysis of virus yields from single cells.
J. Exptl. Med. 1954, 99, 183

38. EATON M.D., MEIKLEJOHN G., VAN HERICK W.
Studies on the etiology of primary atypical pneumonia.
A filterable agent transmissibke to cotton rats, hamsters and chick embryos.
J. Exptl. Med. 1944. 79 649 - 668

39. EATON M.D. .
Action of aureomycin and chloromycetin on viruses of primary atypical pneumonia.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1950, 73, 24 - 26

40. EATON M.D., LIU C.
Studies on sensitivity to strptomycin of the atypical pneumonia agent.
J. Bacteriology, 1957, 74, 784 - 787

41. EBISAWA I., NAKAMURA S., KITAMOTO O., SATO T.
Preparation and Freez-drying of High titered Mycoplasma pneumoniae complement fixing antigen.
Japan J. Exp. Med. 1968, 38, - 2, 119 -122.

42. EDWARD D.G.
An investigation of the biological properties of organisms of the pleuro pneumonia group, with suggestions regarding the identification of strains.
J. Gen. Microbiol. 1950, 4, 311 - 329

43. EDWARD D.G.
The pleuropneumonia group of organisms = a review together with some new observations
J. Gen. Microbiol. 1954, 10, 27 - 64

44. EDWARD D.G., and FITZGERALD W.A.
Inhibition of growth of PPLO by antibody
J. Path. Bact. 1954, 68, 23 - 30

45. EDWARD D.G. and FREUNDT E.A.
The classification and nomenclature of organisms of the pleuro-pneumonia like group.
J. Gen. Microb. 1956, 14, 197 - 207

46. ENG J.
Studies on the complement fixation test with Mycoplasma pneumoniae antigen. I : Production of antigen.
Acta Path. and Microbiol. Scandinav. 1967, 71, 79 - 88

47 EVANS A.S., BROBST M.S.
Bronchitis, pneumonitis and pneumonia in University of Wisconsin students.
New Engl. J. Med. 1961, 265, 401 - 407

48 EVANS A.S., ALLEN V., SVELTMANN S.
Mycoplasma pneumoniae infections in University of Wisconsin students.
Am. Rev. od Respir. Dis. 1967, 96, 237 - 243

49. FEIZI T. and TAYLOR-ROBINSON D.
Cold agglutinin anti - I and Mycoplasma pneumoniae
Immunology - 1967, 13, 405 - 409

50. FELDMAN H.A., SUHS R.H.
Serelogic epidemiologic studies with M. pneumoniae. I : demonstration of an hemagglutinin and its inhibition by antibody.
Am. J. Epid. 1966, 83, 345 - 356

51. FERNALD G.W., CLYDE W.A. jr, DENNY F.
Nature of the immune response to Mycoplasma pneumoniae
J. Immunol. 1967, 98, 1028 - 1038

52. FERNALD G.W., WALLACE A.C., DENNY F.
Factors influencing growth inhibition of Mycoplasma pneumoniae by immune sera.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1967, 126, 161 - 166

53. FORSYTH B.R., HENRY M.D., BLOOM H.H., JOHNSON K.M., CHANOCK R.M.
Etiology of primary atypical pneumonia in a military population.
J.A.M.A. 1965, 191, 364 - 368

54. FOY H.M., GRAYSTON J.T., KENNY G.E., ALEXANDER E.R., MAC MAHAN R.
Epidemiology of Mycoplasma pneumoniae infections in families.
The J. of the Am. Med. Assoc. 1966, 197, 859 - 866

55. FREUNDT E.A.
The Mycoplasmataceae = Morphology, biology and taxonomy.
Aerhuns. Stiftsbogtrykkerie, Copenhagen, 1958 (Engl. Trans. by H. COWAN).

56. FREUNDT E.A.
Report presented at WHO meeting on Mycoplasma
Leiden, Holland, 1962

57. GLEZEN W.P., THORNBURG G., CHIN D.Y., WENNER H.A.
Significance of Mycoplasma infections in children with respiratory disease.
Pediatrics, 1967, 39, 516 - 524

58. GOODBURN G.M., MARMION B.P.
A study of the properties of Eaton's primary atypical pneumonia organism
J. Gen. Microb. 1962, 29 - 271

59. GOODBURN G.M., MARMION B.P., KENDALL E.J.C.
Infection with Eaton's primary atypical pneumonia agent in England
Brit. Med. J. 1963, I, 1266

60. GRAYSON J.T., ALEXANDER E.R., KENNY G.E., CLARKE E.R., FREMONT J.C., Mac COLL W.A.
Mycoplasma pneumoniae infections = clinical and epidemiologic studies.
The J. of Am. Med. Assoc. 1965, 191, 369 - 374

61. GRIFFIN J.P., CRAWFORD Y.E.
Mycoplasma pneumoniae in primary atypical pneumonia
J. A. M. A. 1965, 193, 1011 - 1016

62. HAYFLICK L.
Tissues cultures and Mycoplasmas.
Tex. Rep. Biol. Med. 1965, 23, 285 - 303

63. HAYFLICK L. and CHANOCK R.M.
Mycoplasma species of man
Bact. Rev. 1965, 29, 185

64. HUBERT E.G., KALMANSON G.M., GUZE L.B.
Preservation of antigen - coated sheep erythrocytes by freezing for use in indirect hemagglutination procedure.
J. Bacteriol. 1963 86, 569

65. HUIJMANS - EVERS A.G. M., RUYS A.C.
Microorganisms of the pleuropneumonia group (family of mycoplasmataceae) in man
Antonie van leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 1956, 22, 377

66. JANSSON E.
Préparation of complement - fixing antigen for routine use in diagnosis of Eaton pneumonia.
J. Clin. Path. 1964, 17, 458 - 460

67. JAO R.L., RUBENIS M., JACKSON G.G.
Isolation of Mycoplasma pneumoniae from adults with respiratory infections.
Arch. Intern. Med. USA 1966, 117, 520 - 526

68. JENSEN K.E.
Measurement of growyh inhibiting antibody for Mycoplasma pneumoniae.
J. Bacteriol. 1963, 86, 1349 - 1350

69. JENSEN K.J., SENTERFIT L.B., SCULLY W.E., CONWAY T.J., WEST R.F., DRUMMY W.W.
Mycoplasma pneumoniae infections in children. An epidemiologic appraisal in families treated with oxytetracycline
Amer. J. Epidemiol. 1967, 86, 419 - 432

70. JOHN J.T., STAHL M., FULGINITI V.A.
Cumulative hemagglutination by Mycoplasma pneumoniae and other agglutinins
J. Bacteriol. 1966, 92, 1002 - 1004

71. JOHN J.T., STAHL M., FULGINITI V.A.
Direct hemagglutination by Mycoplasma pneumoniae and its inhibition by immune serum.
J. of Med. Microb. 1969, 2, 131 - 135

72. KENDE M.
Antibody response of animals to Mycoplasma pneumoniae mesured by latex agglutination.
Applied. Microb. 1969, 17, 275 - 279

73. KENNY G.E., GRAYSTON J.T.
Eaton Pleuro pneumoniae like organism (Mycoplasma pneumoniae) complement fixing antigen = extraction with organic solvents.
J. Immunol. 1965, 95, 19

74. KEER K.M., MASCOLI C.C., OLSON N.O., CAMPBELL A.
Rapid specific agglutination of Eaton Agent (Mycoplasma pneumoniae)
J. Bact. 1964, 87, 478 - 479

75. KITAMOTO O., NAKAMURA S., EBISAWA I., SATO T.
Mycoplasma pneumoniae infection in atypical pneumonia in The Tokio area.
Japan J. Exptl. Med. 1966, 36, 291 - 299

76. KLIENEBERGER - NOBEL E.
Pleuropneumonia - like organismes (PPLO) - mycoplasmataceae.
Acad. Press, London and New-York, 1962.

77. KRAYBILL W.H. and CRAWFORD Y.E.
A selective medium and color test for mycoplasma pneumoniae.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1965, 118, 965 - 970

78. LARIN N.M., SAXBY N.V., WILLIAMSON G.M., BUGGEY D. KENWRIGHT N.S.
In vitro susceptibility of Mycoplasma pneumoniae to tetracyclines.
Amer. Soc. of Microbiol. 1967, 680 - 686

79. LARIN N.M., SAXBY N.V., BUGGEY D.
Quantitative aspects of Mycoplasma pneumoniae cell relationships in cultures of lung diploïd fibroblasts.
J. Hyg. Camb. 1969, 67 375 - 384

80. LEMCKE R.M., MARMION B.P., PLACKETT P.
Immunocheminal analysis of Mycoplasma pneumoniae
Ann. N Y - Acad. Sci. 1967, 143, 691 - 702

81. LENNETTE E.H.
Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases.
Amer. Public Health Association (ed - by E.H. Lennette and N.J. Schmidt) New York - 1964

82. LIND K.
Isolation of Mycoplasma pneumoniae (Eaton agent) from patients with primary atypical pneumonia.
Acta Path and Microbiol. Scand. 1966, 66, 124 - 134

83. LIU C.
Studies on primary atypical pneumonia
I = localisation, isolation and cultivation of a virus in chick embryos.
J. Exptl. Med. 1957, 106, 455 - 467

84. LIU C., BATON M.D., HEYL J.T.
Studies on primary atypical pneumonia. Observations concerning the development and immunological characteristics of antibody in patients.
J. Exptl. Med. 1959, 109, 545 - 556

85. LIU C.
Studies on primary atypical pneumonia :
III= A factor in normal serum which enhances the reaction between PAP virus and convalescent serum.
J. Exptl. Med. 1961, 113, 111 - 123

86. LYELL A., GORDON A.M., DICK H.M., SOMMERVILLE R.G.
Mycoplasmas and Erythema multiforme.
The Lancet 1967, ii, 1116 - 1118

87. Mac GEE Z.A., ROGUL M., FALKOW S., WITTLER R.G.
The relationship of Mycoplasma penumoniae (Eaton Agent) to Streptococcus M G. = application of genetic tests to determine relatedness of L formes and PPLO to bacteria.
Proc. Ntl. Acad. Sci. 1965, 54, 457 - 461

88. MAISEL J.C., BABBIT L.H., JOH? T.J.
Fatal Mycoplasma pneumoniae infection with isolation of organisms from lung.
The J. of the Am. Med. Assoc. 1967, 202, 287 - 290

89. MANCHEE R.J. and TAYLOR - ROBINSON D.
Haemadsorption and hemagglutination by Mycoplasma.
J. Gen. Microbiol. 1968, 50, 465 - 478

90. MANCHEE R.J. and TAYLOR - ROBINSON D.
Utilization of neuraminic acid receptors by Mycoplasmas.
J. of Bacteriol. 1969, 98, 914 - 919

91. MARMION B.P., GOODBURN G.M.
Brit. Med. J. 1960, 1, 1137 - 1147

92. MARMION B.P., GOODBURN G.M.
Effect of an organic gold salt on Eaton's primary atypical pneumoniae organisms and other observations.
Nature, 1961, 189, 247

93. MARMION B.P., HERS J.F.
Observation of Eaton primary atypical pneumonia agent and analogous problems in animals.
Am. Rev. Resp. Dis. 1963, 88, 198 - 211

94. MEIKLEJOHN G., THALMAN W.G., WALIGORA D.J., KEMPE C.H., LENNETTE E.M.
Chemotherapy of primary atypical pneumonia
J.A. M. A. 1954, 154, 553 - 557

95. MUFSON M.A., SANDERS V., WOOD S.C., CHANOCK R.M.
Primary atypical pneumonia due to Mycoplasma pneumoniae. (Eaton Agent) - Report of a case with a residual pleural asnormality.
New Engl. J. of Med. 1963, 268, 1109 - 1111

96. MUFSON M.A., CHANG V., GILL V., WOOD S.C., ROMANSKY M.J. and CHANOCK R.M.
The role of viruses, mycoplasmas and bacteria in acute pneumonia in civilian adults.
Am. J. Epidemiol 1967, 86, 525 - 544

97. OFFENHAUER R.
Uber das Vorkommen Von Komplement bindenden Antikörpen gegen Mycoplasma pneumoniae in der gesunden Bevölkerung.
Z - Immunoforsch - 1967, 133, 144 - 152

98. OLSON N.O., SHELTON D.C., MUNRO D.A.
Infections synovitis control by medication - Effect of strain differences and pleuropneumonia - like organisms.
Amer. J. Vet. Res. 1957, 18, 735 - 739

99. PEROL Y.
Mycoplasma pneumoniae - Son rôle en pathologie humaine.
"Progrès en pathologie infectieuse". Ed. Medicales Flammarion, 1967, 11 - 36.

100. PETERSON O.L., HAM T.H., FINLAND M.
Cold agglutinins in primary atypical pneumonias
Science, 1943, 97, 167 - 168

101. PLACKETT P., MARMION B.P., SHAW E.J., LEMCKE R.M.
Immunochemical analysis of Mycoplasma pneumoniae. 3 = Separation and chemical identification of serologically active lipids.
Aust. J. Exptl. Biol. med. Sci. 1967, 47, 171 - 195

102. PRESCOTT B., SOBESLAVSKY O., CALDES G., CHANOCK R.M.
Isolation and characterization of fractions of mycoplasma pneumoniae.
I: chemical and chromatographic separation.
J. of Bacteriol. 1966, 91, 2117 - 2124

103. PRESCOTT B., SOBESLAVSKY O., CALDES G., CHANOCK R.M.
Isolation and characterization of fractions of mycoplasma pneumoniae.
II = Antigenicity and immunogenicity.
J. of Bacteriol. 1966, 91, 2126 - 2138

104. PRESCOTTB., CALDES G., JAMES W.D., CHANOCK R.M.
Phospholipid hapten of Mycoplasma penumoniae
Ann. N Y Acad. Sci. 1967, 143, 497 - 500

105. SCHMIDT P.J., BARILE, Mac GUINNISS M.H.
Nature, 1965 - 205, 371

106. SCHMIDT N.J., LENNETTE E.H., DENNIS J. GEE P.S.
On the nature of complement fixing antibodies to mycoplasma pneumoniae
J. of Immunol. 1966, 97, 95

107. SENTERFIT L.B. and JENSEN K.E.
Antimetabolic antibodies to Mycoplasma pneumoniae mesured by tetrazolium reduction inhibition.
P.S.E.B.M. 1966, 122, 786 - 790

108. SEVER J.L.
Application of a microtechnique to viral serological investigations
J. Immun. 1962, 88, 320

109. SIEBER O.F., JOHN T.J., FULGINITI V.A., OVERHOLT E.C.
Stevens - Johson Syndrome associated with Mycoplasma pneumoniae infection.
J. A. M. A. 1967, 200, 79 - 81

110. SLOTKIN R.I., CLYDE W.A., DENNY F.W.
The effect of antibiotics on Mycoplasma pneumoniae in vitro and in vivo.
Am. J. of Epidemiol. 1967, 86, 225 - 237

111. SMITH P.F.
Comparative physiology of pleuropneumonia - like and L - type organisms.
Bacteriol. Rev. 1964, 28, 97 - 125

112. SMITH C.B., ALFORD R.H. CHANOCK R.M.
Volonteer studies with Mycoplasma pneumoniae. Spectrum of illness produced and protective effect of inactivated vaccin.
N Y Acad. Sci. 2nd Conf. on Biol. on Mycoplasma 1966

113. SMITH C.B., Mac GUINNISS M.H., SCHMIDT P.J.
Changes in erythrocyre - I agglutinogen and anti I agglutinins during Mycoplasma pneumoniae infection in man.
J. of Immunol. 1967, 99, 333 - 338

114. SOBESLAVSKY O., SYRUCEK L., BRUCKOVA M. and ABRAHAMOVIC M.
The etiological role of Microplasma pneumoniae in otitis media in children.
Pediatrics, 1965, 35, 652 - 657

115. SOBESLAVSKY O., PRESCOTT B., JAMES W.D., CHANOCK R.M.
Isolation and characterization of fractions of Mycoplasma pneumoniae.
II = Antigenicity and Immunogenicity
J. Bact. 1966, 91, 2126 - 2138

116. SOBESLAVSKY O., PRESCOTT B., JAMES W.D., CHANOCK R.M.
Isolation and immunogenic activities of different fractions of Mycoplasma pneumoniae.
Ann. N Y - Acad. Sci. 1967, 143, 682 - 690

117. SOBESLAVSKY O., PRESCOTT B., CHANOCK R.M.
Adsorption of Mycoplasma penumoniae to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulence.
J. Bact. 1968, 96, 695 - 705

118. SOMERSON N.L., TAYLOR - ROBINSON D., CHANOCK R.M.
Hemolysin production as an aid in the identification and quantitation of Eaton agent.
Am. J. Hygiène 1963, 77, 122 - 128

119. SOMERSON N., PURCELL R.H., TAYLOR-ROBINSON D., CHANOCK R.M.
Hemolysin of Mycoplasma pneumoniae
J. Bact. 1965, 89, 813 - 818

120. SOMERSON N.L., WALLS B.E., CHANOCK R.M.
Hemolysin of Mycoplasma pneumoniae: tentative of identification as a peroxyde.
National Inst. of Allergy and Inf. Dis. 1965, 150, (N° 3693),226-228

121. SOMERSON N.L., JAMES W.D., WALLS B.E., CHANOCK R.M.
Growth of Mycoplasma pneumoniae on a glass surface
Ann. N Y Acad. Sci. 1967, 148, 384 - 389

122. STAVITSKY A.B.
Micromethodes for the study of proteins and antibodies. II specific applications of hemagglutination and hemagglutination - inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells.
J. Immunol. 1954, 72, 360

123. STEINBERG P., WHITE R.J., FULD S.L., GUTEKUNST R.R., CHANOCK R.M. SENTERFIT L.B.
Ecology of Mycoplasma pneumoniae infections in marine recruits at Parris Island, South Carolina
Am. J. Epidem, 1968, 89, 62 - 73

124. TAYLOR - ROBINSON D., SOMERSON N.L., TURNER H.C., CHANOCK R.M.
Serological relationship among human Mycoplasmas as shown by complement fixation and gel diffusion.
J. Bact. 1963, 85, 1261 - 1273

125. TAYLOR - ROBINSON D., SOBESLAVSKY O., CHANOCK R.M.
Relationship of Mycoplasma pneumoniae to other human Mycoplasma species studied by gel diffusion.
J. Bact. 1965, 90, 1432 - 1437

126. TAYLOR ROBINSON D., PURCELL R.H., WONG D.C., CHANOCK R.M.
A colour test for measurement of antibody to certain Mycoplasma species based upon the inhibition of acid production.
J. Hyg. Camb. 1966, 64, 91 - 104

127. TAYLOR - ROBINSON D., SHIRAI A., SOBESLAVSKY O., CHANOCK R.M.
Serologic response to Mycoplasma pneumoniae infections.
II Significance of antibody measured by different techniques.
Amer. J. of Epid. 1966, 84, 1 - 13

128. TAYLOR - ROBINSON D., SOBESLAVSKY O., JENSEN K.E., SENTERFIT L.B., CHANOCK R.M.
Serologic response to Mycoplasma pneumoniae infection.
Amer. J. Epidemiol. 1966, 83, 287 - 298

129. TAYLOR - ROBINSON D., MANCHEE R.J.
Adherence of Mycoplasma to glass and plastic
J. Bact. 1967, 94, 1781 - 1782

130. TAYLOR - ROBINSON D., MANCHEE R.J.
Spermadsorption and spermagglutination by Mycoplasmas
Nature (London) 1967, 215, 484 - 487

131. TAYLOR - ROBINSON D., MANCHEE R.J.
Novel approach to studying relationships between Mycoplasmas and tissu culture cells.
Nature (London) 1967, 216, 1306 - 1307

132. THIVOLET J., FRIES D., KRATCHKO A.,
Revue Lyon Med. 1961, 10, 1027 - 1036

133. THIVOLET J., SOHIER R., PICARD M., BLANC G.
Application de la méthode d'immunofluorescence au diagnostic de la pneumopathie due au Mycoplasma de Eaton
Aun. Inst. Pasteur 1963, 105, 749 - 756

134. THOMAS L., MIRICK G.S., CURNEN E.C., ZIEGLER J.E., HORSFALL F.L.
Serological reactions with an indifferent streptococcus in primary atypical pneumonia.
Science, 1943, 98, 566 - 568

135. THOMAS L. MIRICK G.S., CURNEN E.C., ZIEGLER J.E., HORSFALL F.L.
Studies on primary atypical pneumonia II = observations concerning the relationship of a non hemolytic streptococcus in the disease.
J. Clin. Inv. 1945, 24, 227

136. TURNER J.C.
Development of cold agglutinins in atypical pneumonia
Nature 1943, 151 419

137. TURNER J.A.P., BURCHAK E.C., BAUNATYNE R.M., FLEMING P.C.
The protean manifestations of Mycoplasma infections in childhood
The Canadian Medical Association Journal, 1968, 99 633 - 637

138. UHR J.W., FINKELSTEIN M.S.
Antibody formation - IV Formation of rapidly and slowly sedimenting antibodies and immunological memory to bacteriophage.
Exp. Med. 1963, 117, 457 - 477

139. URID J. et GRABAR P.
Colorants dans l'analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique en milieu gélifié.
Ann. Inst. Pasteur 1956, 90, 427 - 440

140. VAN DER VEEN J. VAN NUNEN M.C.J.
Role of Mycoplasma pneumoniae in acute respiratory disease in a military population.
The Am. J. of Hyg. 1963, 78, 293 - 301

141. VAN HERICK W., EATON M.D.
An unidentified pleuropneumonia - like organism isolated during passages in chick embryos.
J. Bact. 1945, 50, 47 - 55

142. VOORS A.W. and STEWART G.T.
Biomathematical analysis of Mycoplasma infection in marine recruits
Am. Rev. of Reps. Dis. 1968, 97, 515 - 523

143. WARREN J.
Observations of some biological characteristics of organisms of the pleuropneumonia group.
J. Bact. 1942, 43, 211 - 228

144. WEINER A.S., UNGER L.J., COHEN L., FELDMAN J.
Ann. Intern. Med. 1956, 44, 221

145. WITZLEB W., SPROSSIG M., AUGER G., HEIDLER S.
Respiratory disease due to Mycoplasma pneumoniae.
German Medical Monthly 1966, XI, 345 - 348